บทที่ 4

บทวิจารณ์

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์หลัก คือ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อรา Aspergillus niger A 185 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์เป็นสารแหล่งคาร์บอน และผลิตโดยกระบวนการหมักในอาหารเหลว ปัจจุบันการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมในประเทศไทยยังใช้กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นสารแหล่งคาร์บอน ซึ่งโรงงานที่ผลิตกรดมะนาวเพื่อป้อนตลาดในไทยมีเพียงโรงงานเดียว ได้แก่ บริษัทอุตสาหกรรมกรดมะนาว จำกัด แต่ปริมาณการผลิตยังไม่เพียงพอแก่ความต้องการของตลาดภายในประเทศ ทำให้มีการนำเข้ากรดมะนาวจากต่างประเทศในปริมาณมาก (ตารางที่ 3) ถึงแม้ว่าการพัฒนาการผลิตกรดมะนาวที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมจะก้าวหน้าไปมาก แต่ข้อมูลเหล่านั้นจะถูกเก็บเป็นความลับ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาหาเชื้อราสายพันธุ์ที่ดี ใช้สารแหล่งวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในประเทศ รวมทั้งองค์ประกอบอื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการผลิตกรดมะนาว เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนต่อไป

วิธีการตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรด เพื่อคัดเลือกเชื้อรา Aspergillus niger สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพียงบางสายพันธุ์ จากเชื้อที่มีอยู่ 12 สายพันธุ์มีหลายวิธี J.W.Foster(31) ใช้วิธีเติมอินดิเคเตอร์คือ บรอมครีซอลกรีน (bromcresol green) ลงในอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรส ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำเงิน เมื่อเชื้อราเจริญและสร้างกรดแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่รอบโคโลนีของเชื้อราจะถูกเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง แต่วิธีการนี้ไม่สามารถตรวจสอบชนิดและปริมาณของกรดที่เชื้อราผลิตออกมาได้ จึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็นวิธีคัดเลือกเชื้อรา ส่วนวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี (Paper chromatography)(34) พบว่า ไม่สามารถ

แยกกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริค ออกจากกันได้ ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะใช้วิธีนี้เพื่อตรวจสอบกรดมะนาว

การตรวจสอบโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography) (33) ทำโดยนำตัวอย่างมาอบแห้งแล้วนำมาสกัดด้วย กรดซัลฟุริกในเมธานอล และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) เพื่อตรวจสอบเมธิลเอสเทอร์ (methyl esters) ของกรดด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟีนั้น มีขั้นตอนการเตรียมเอสเทอร์ (esters) ของกรดยุ่งยากหลายขั้นตอน และถ้ามีการปนเปื้อนโมเลกุลของน้ำในช่วงที่ทำการสกัดจะทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน และที่สำคัญ คือ ไม่สามารถแยกพีค (peak) ของกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริค ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ จึงมาพิจารณาวิธีไพริดีน-อะซิติคแอนไฮไดรด์ (Pyridine-acetic anhydride method)(35) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน คือ นำตัวอย่างมาเติมไพริดีน (pyridine) และอะซิติคแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) แล้วนำมาอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 32 °ซ. นาน 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยากแต่สารเคมีที่ใช้ทั้งสองชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และเมื่อนำกรดไอโซซิตริคมาผ่านกระบวนการต่างๆ ตามที่กล่าวมา พบว่า สามารถอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรได้ ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จากการใช้วิธีไพริดีน-อะซิติคแอนไฮไดรด์ อาจจะไม่ได้เป็นค่าของกรดมะนาวเพียงอย่างเดียว จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะในการตรวจสอบกรดมะนาวสำหรับงานวิจัย

การตรวจสอบโดยวิธี HPLC (High-performance liguid chromatography)(36) สามารถตรวจสอบกรดมะนาวได้โดยตรงโดยใช้คอลัมน์เฉพาะ เช่น Aminex HPX-87H ที่มีราคาแพง และหาซื้อได้ยาก นอกจากนี้การตรวจสอบปริมาณกรดมะนาวจะทำได้โดยการฉีดสารตัวอย่างที่ไม่ผ่านการเตรียมเหมือนกับวิธีโครมาโตกราฟี ทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์ลดลง เนื่องจากน้ำหมักที่ได้จากการหมักกรดมะนาวโดยเชื้อรา มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 1.5-2.0 ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรด ในงานวิจัยนี้จึงไม่เลือกใช้การตรวจสอบกรดมะนาวโดยวิธี HPLC

วิธีติเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (20,25) เป็นการตรวจสอบปริมาณกรดทั้งหมดที่เชื้อราผลิต โดยนำน้ำหมักที่ได้จากการทดลองมาติเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีฟีนอลฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ วิธีเพนตาโบรโมอะซิโตน (37) เป็นวิธีการตรวจสอบกรดมะนาว ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดมะนาว และให้สีซึ่งสามารถตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงได้ วิธีนี้จะไม่เกิดปฏิกิริยากับสารอื่น เช่น ไขมัน (fatty acids) อะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เอธานอล (ethanol) กลูโคส และกรดอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ กรดไอโซซิตริค กรดซัคซินิค กรดอัลฟาคีโตกลูตาริค เป็นต้น จากการทดลองนำกรดอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดมะนาว เช่น กรดไอโซซิตริค มาทดลองตามวิธีเพนตาโบรโมอะซิโตน พบว่า ไม่สามารถอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรได้ แสดงว่า วิธีเพนตาโบรโมอะซิโตนมีความเฉพาะเจาะจงต่อกรดมะนาว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธีเพนตาโบรโมอะซิโตนซึ่งเป็นวิธีเหมาะที่สุดที่ใช้ตรวจสอบกรดมะนาว และ ใช้การติเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นวิธีตรวจสอบกรดทั้งหมด

แป้งที่ย่อยแล้วเป็นของเหลวที่ได้จากการนำแป้งมันสำปะหลัง มาย่อยสลายโดยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสของโนโว (NOVO)(ภาคผนวกที่3) แล้วนำส่วนที่ใสที่กรองได้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดมะนาว แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่หาได้ง่ายในประเทศไทย มีราคาโดยเฉลี่ยกิโลกรัมละ 3-5 บาท (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์) การเลือกนำแป้งมันสำปะหลังมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรม และเป็นการนำวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาเปลี่ยนแปลงให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาแพงขึ้น จากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดเชื้อรา Aspergillus niger ทั้ง 12 สายพันธุ์โดยใช้แป้งที่ย่อยแล้วเป็นสารแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อราทั้ง 12 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตและสร้างกรดได้ในปริมาณแตกต่างกัน กล่าวคือ A . niger A 185 เป็นเชื้อราที่สามารถใช้แป้งที่ย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิตกรดทั้งหมดได้สูงสุดคือ 120 กรัม/ลิตร ดังนั้นจึงได้คัดเลือก A . niger A 185 ที่ใช้แป้งที่ย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่องานวิจัยในขั้นต่อไป

การหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวโดยทั่วไป นิยมเติมเชื้อราลงในอาหารโดยเติมสปอร์แขวนลอย หรือเติมหัวเชื้อ ทั้งนี้ขึ้นกับกระบวนการที่ใช้หมัก ถ้าใช้กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง นิยมเติมสปอร์ลงบนอาหารโดยตรง แต่ถ้าใช้กระบวนการหมักบนผิวของอาหารเหลว อาจพ่นสปอร์ลงบนผิวอาหารโดยตรง หรือใช้สายใยที่ได้จากการหมักในครั้งก่อน ส่วนกระบวนการหมักในอาหารเหลว นิยมเตรียมหัวเชื้อในถังหมักขนาดเล็กก่อน จึงถ่ายลงสู่ถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อลดระยะเวลาในการหมัก และช่วยให้เชื้อราปรับตัวได้ดีขึ้น (2,8) จากผลการตรวจสอบการเจริญของเชื้อรา A . niger A 185 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ได้จากผลการทดลองที่ 2.1 นั้น พบว่า เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $1x10^6$ สปอร์/มล. สปอร์เจริญเป็นกลุ่มสายใยขนาดใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลางของกลุ่มสายใยมากกว่า 1 มม. และถ้านำไปใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวแล้ว กลุ่มสายใยจะเจริญและมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้สายใยด้านในได้รับอาหารไม่เพียงพอ สำหรับการใช้จำนวนสปอร์ $1x10^7$ และ $1x10^8$ สปอร์/มล. เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มสายใยขนาดเล็กและเส้นใยกระจายดี ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว แต่การเตรียมสปอร์แขวนลอยสำหรับหัวเชื้อที่มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น $1x10^8$ สปอร์/มล. มีขั้นตอนการเตรียมหลายขั้นตอนทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นสามารถปนเปื้อนได้ง่าย นอกจากนี้น้ำหนักเซลล์แห้งที่จุดกึ่งกลางการเจริญแบบทวีคูณของการใช้จำนวนสปอร์ $1x10^7$ สปอร์/มล. มีค่าสูงกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้จำนวนสปอร์ $1x10^8$ สปอร์/มล. ดังนั้นหัวเชื้อที่มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น $1x10^7$ สปอร์/มล. จึงเป็นหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว

เชื้อรา A . niger โดยทั่วไปสามารถใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตกรดมะนาวได้หลายชนิด เช่น กลูโคส น้ำเชื่อม กากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น แหล่งคาร์บอนที่เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะถูกนำมาย่อยโดยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสก่อน จึงนำไปใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้จากการนำแป้งมันสำปะหลังมาย่อยโดยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสของโนโวซึ่งประกอบด้วย AMG เทอร์มามิล (termamyl) และโปรโมไซม์ (promozye) โดยนำเอนไซม์เหล่านี้มาย่อยแป้งมันสำปะหลังตามวิธีในภาคผนวกที่ 3 จากนั้นจึงตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของส่วนใสที่กรองได้ และพบว่า จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังนี้ จะ

ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ตามรายงาน พบว่า กลูโคส และ ฟรุกโตสสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ออกโซกลูตาเรท ดีไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยเปลี่ยนอัลฟา-คีโตกลูตาเรท ให้เป็นซัคซินิลโคเอในวัฏจักรเครบ ทำให้เกิดการสะสมกรดมะนาว (19) Doelger และ Prescott (1) พบว่า ถ้ามีปริมาณน้ำตาลที่มากเกินพอ น้ำตาลส่วนที่เหลือจะไม่ถูกเปลี่ยนแปลงเป็นกรดมมะนาว เนื่องจากเชื้อราจะนำไปใช้ในการสร้างพลังงานเพื่อการดำรงชีพ ทำให้มีการสะสมกรดมะนาวลดลง ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องให้สารแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่พอเหมาะ จากการแปรผันปริมาณแป้งที่ย่อยแล้ว เพื่อหาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับ A . niger A 185 ในการผลิตกรดมะนาว พบว่า แป้งที่ย่อยแล้วที่มีค่าเด็กโตรสอิควิวาเลนท์ร้อยละ 86 ปริมาณ 450 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาว

A. Wongwicharn และคณะ (25) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน ต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A . niger โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เปปโตน ผงยีสต์สกัด และกากถั่วเหลือง ช่วยให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ดี คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และยูเรีย แต่เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจะนิยมใช้แอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราสามารถใช้สารแหล่งไนโตรเจนได้ทั้ง แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (17) กากถั่วเหลือง และกากรำข้าว จัดเป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่หาได้ง่ายในประเทศไทย จึงน่าจะนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่จากผลการทดลองที่ 2.2.2 ซึ่งทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.7 กรัม/ลิตร พบว่า แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ คอร์นสตีปลิเคอร์ ผงยีสต์สกัด ผงเนื้อสกัด กากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว และ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของรำข้าวที่สกัดไขมันแล้ว เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีกว่าการผลิตกรดมะนาว ทำให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงมาก ส่วนแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต

พบว่า แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ช่วยให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ผลผลิตสูง ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ดังนั้นแอมโมเนียมซัลเฟตจึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ A . niger A 185

แหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อรา ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะช่วยให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณมาก แต่ถ้าแหล่งไนโตรเจนมีมากเกินความต้องการจะทำให้ระยะการเจริญเติบโตกินเวลานาน และ ทำให้ขั้นตอนการผลิตกรดมะนาวเกิดขึ้นล่าช้าด้วย (8) จากการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในผลการทดลองที่ 2.2.3 พบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 2.5 3.5 และ 4.5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ A . niger A 185 สามารถผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณใกล้เคียงกัน ได้แก่ 115 112 และ 110 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8) การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 2.5 กรัม/ลิตร ก็เพียงพอที่จะช่วยให้เชื้อรา A . niger A 185 ผลิตกรดมะนาวได้ในปริมาณมากแล้ว ถึงแม้จะเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 3.5 หรือ 4.5 กรัม/ลิตร ก็ไม่ทำให้เชื้อรา A . niger A 185 ผลิตกรดมะนาวเพิ่มมากขึ้นอีก ดังนั้นปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 2.5 กรัม/ลิตรจึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A . niger A 185

ฟอสเฟต เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา Steel และคณะ (30) ได้ศึกษาผลของโปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการผลิตกรดมะนาวในกระบวนการหมักในอาหารเหลว พบว่า ฟอสเฟตมีผลต่อชนิดของกรดที่เชื้อราสร้างขึ้น กล่าวคือ ถ้าบราศจากการเติมฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว เชื้อราจะผลิตกรดออกซาลิคเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แต่ถ้าเติมฟอสเฟตปริมาณ 0.5 กรัม/ลิตร เชื้อราจะสร้างกรดมะนาวในปริมาณมาก Martin และคณะ (11)ได้ตรวจสอบผลของการเติมฟอสเฟต ต่อการผลิตกรดอินทรีย์ของเชื้อ A . niger โดยกระบวนการหมักในอาหารเหลว พบว่า การเติมฟอสเฟตในปริมาณน้อยจะทำให้เชื้อราเจริญเติบโตและผลิตกรดออกซาลิคแทนการผลิตกรดมะนาว

Shu และ Johnson (10) รายงานว่า การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ A. niger ต้องการฟอสเฟตสูงถึง 5 กรัม/ลิตร และ การใช้ฟอสเฟตในปริมาณต่ำจะช่วยให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ เมื่อมีเหล็กและสังกะสีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก สำหรับเชื้อ A. niger A 185 อาจต้องการฟอสเฟตเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตในปริมาณมาก จากผลการทดลองที่ 2.2.4.1 เมื่อทำการแปรผันปริมาณโปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่า ปริมาณโปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม/ลิตร เชื้อรา A. niger A 185 ผลิตกรดมะนาวสูงสุด 42 กรัม/ลิตร และผลิตกรดทั้งหมดได้สูงสุดเท่ากับ 154 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 9) และเมื่อใช้โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 0.4 กรัม/ลิตร ในผลการทดลองที่ 2.2.4.2 พบว่า เชื้อรา A. niger A 185 จะผลิตกรดมะนาว และกรดทั้งหมดสูงสุดคือ 63 และ 228 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ซึ่งปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากผลการทดลองที่ 2.2.4.1 และ 2.2.4.2 เป็นค่าที่ต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการทดลองที่ 2.2.3 ได้แก่ 115 กรัม/ลิตรโดยใช้โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม/ลิตร ร่วมกับโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม/ลิตร ดังนั้นในการทดลองที่ 2.2.4.3 จึงทำการแปรผันปริมาณโปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต ร่วมกับ โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในอัตราส่วน 1:1 พบว่า เมื่อใช้ฟอสเฟตในอัตราส่วน 1.0:1.0 และ 1.5:1.5 กรัม/ลิตร เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีมาก ทำให้น้ำหนักเซลแห้งสูงถึง 13.2 และ 15.6 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ปริมาณฟอสเฟตที่มากเกินพอจะทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราเกิดขึ้นได้ดี แต่ขณะเดียวกันก็ทำให้การผลิตกรดมะนาวลดต่ำลงด้วย (8) ปริมาณฟอสเฟตที่แปรผันร่วมกัน 2 ชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว คือ โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 กรัม/ลิตรและ โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 0.4 กรัม/ลิตร ซึ่งช่วยให้เชื้อราผลิตกรดมะนาว และกรดทั้งหมดสูงสุดได้แก่ 119 และ 272 กรัม/ลิตร ตามลำดับ อัตราส่วนนี้จึงเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดของโปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต และโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ใช้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ A. niger A 185

แร่ธาตุเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา Aspergillus niger การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A . niger ด้วยกระบวนการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว จำเป็นต้องมีการควบคุมปริมาณแร่ธาตุให้พอเหมาะ ความเข้มข้นของแร่ธาตุแต่ละชนิด จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อรา และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ (1,28) A . niger สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวต้องการแร่ธาตุสำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ เหล็ก สังกะสี ทองแดง และแมงกานิส

เหล็ก เป็นปัจจัยร่วมของเอนไซม์อะโคนิเทส ซึ่งช่วยเปลี่ยนกรดมะนาวให้เป็นกรดไอโซซิตริค (5) ดังนั้นในช่วงที่มีการสะสมกรดมะนาวจะต้องควบคุมปริมาณเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดการทำงานของเอนไซม์อะโคนิเทส (29) จากผลการทดลองที่ 2.2.5 พบว่าปริมาณเหล็กน้อยหรือมากเกินไปจะทำให้ผลผลิตกรดต่ำ แต่ปริมาณเหล็ก 5.0 ส่วนในล้านส่วน ช่วยให้เชื้อผลิตกรดทั้งหมดสูงสุด คือ 302 กรัม/ลิตร แต่ผลิตกรดมะนาวเพียง 123กรัม/ลิตรเท่านั้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมนั้น เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงถึง 149 กรัม/ลิตร อาจเป็นเพราะว่าปริมาณของเหล็ก 5.0 ส่วนในล้านส่วนจะเพิ่มผลผลิตกรดอินทรีย์ชนิดอื่น แทนการผลิตกรดมะนาว

แมงกานีส เป็นปัจจัยร่วมของเอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนสซึ่งช่วยเปลี่ยนกรดไอโซซิตริค ให้เป็น อัลฟา-คีโตกลูตาเรท (5) การเสริมแมงกานีสในปริมาณต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวของเชื้อ A . niger A 185 ไม่ได้ช่วยให้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้น นอกจากนั้น ยังมีผลทำให้การการผลิตกรดมะนาวลดลงเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ A . niger A 185 ในอาหารที่ปราศจากแมงกานีส ดังแสดงในตารางที่ 13.4 ของผลการทดลองที่ 2.2.6 เมื่อเสริมด้วยแมงกานีสในปริมาณต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ A . niger A 185 พบว่าปริมาณแมงกานีส 5.0 ส่วนในล้านส่วนนั้น เชื้อรา A . niger A 185 ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือ 120 กรัม/ลิตร แต่ผลผลิตกรดมะนาวยังต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ A . niger A 185 ในอาหารที่ปราศสจากแมงกานีส คือ 135 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองนี้ ชี้ให้เห็นว่าแมงกานีสนอกจากจะไม่ช่วยเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวแล้ว ยัง

เป็นตัวยับยั้งทำให้การผลิตกรดมะนาวของเชื้อ A . niger A 185 ลดลงด้วย

จากผลการทดลองที่ 2.2.6 พบว่า สังกะสี ที่ปริมาณตั้งแต่ 10 ส่วนในล้านส่วนขึ้นไป จะให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงมาก แต่ผลิตกรดมะนาวในปริมาณต่ำ (ตารางที่ 13.3) จากการเปรียบเทียบกรดมะนาวที่ได้จากผลการทดลองที่ 2.2.6 นั้น เชื้อรา A . niger A 185 จะผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสังกะสี (ชุดควบคุม) คือผลิตกรดมะนาว 141 กรัม/ลิตร แต่สังกะสีปริมาณ 5.0 ส่วนในล้านส่วนช่วยให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ 103 กรัม/ลิตร ซึ่งปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวของชุดควบคุม

จากผลการทดลองที่ 2.2.6 พบว่า ทองแดงที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยให้เชื้อรา A . niger A 185 ผลิตกรดทั้งหมดในปริมาณมาก (ตารางที่ 13.2) แต่มีการผลิตกรดมะนาวต่างกัน คือ เมื่อเติมทองแดง 5.0 ส่วนในล้านส่วน เชื้อราจะผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 132 กรัม/ลิตร ซึ่งปริมาณกรดมะนาวที่ได้นี้มีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวของชุดควบคุม คือ 138 กรัม/ลิตร ดังนั้นการเสริมทองแดงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ A . niger A 185 มีส่วนช่วยเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวได้น้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ปราศจากทองแดง

จากการแปรผันแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิด พบว่า ปริมาณแร่ธาตุแต่ละชนิดที่ช่วยให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงสุด คือ 0.5 ส่วนในล้านส่วน แต่ปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่แร่ธาตุทั้ง 4 ชนิด ดังนั้นเมื่อนำแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.5 ส่วนในล้านส่วน มาแปรผันร่วมกัน พบว่า เมื่อนำแร่ธาตุแต่ละชนิดมาแปรผันร่วมกัน จะช่วยให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี ทำให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงมาก ตั้งแต่ 14.0 กรัม/ลิตรขึ้นไป (ตารางที่ 14). ส่วนปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิดคือ 145 กรัม/ลิตร ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแร่ธาตุทั้ง 4 ชนิด จึงเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อรา A . niger A 185 เพื่อการผลิตกรดมะนาว ทั้งในระดับขวด

เขย่า และในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากผลการทดลองที่ 2.2.7 ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อรา A . niger A 185 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว พบว่า เชื้อราผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 6 วันแรก และผลิตกรดมะนาวสูงสุดในวันที่ 7 (ตารางที่ 15 และรูปที่ 10) เชื้อราผลิตกรดทั้งหมดสูงสุดในช่วงวันที่ 7-9 น้ำตาลรีดิวซ์จะถูกใช้อย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกและลดลงต่ำสุดในวันที่ 6 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.4 และลดลงเหลือ 2.2 ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้น ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักจะอยู่ในช่วง 1.5 - 2.0 ตลอดระยะเวลาการหมัก จากผลการทดลอง แสดงว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวของ A . niger A 185 ประกอบด้วย แป้งที่ย่อยแล้ว 450 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัม/ลิตร โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 กรัม/ลิตร โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 กรัม/ลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรท 0.3 กรัม/ลิตร โดยไม่เติมแร่ธาตุที่สำคัญใดใด ทั้งนี้อาจเนื่องจากในแป้งที่ย่อยแล้ว มีแร่ธาตุอื่น ๆ ปนเปื้อนมามากเพียงพอแก่ความต้องการของเชื้อรา แป้งมันสำปะหลังที่ใช้ไม่ได้มีการตรวจสอบว่า มีแร่ธาตุชนิดใด ในปริมาณเท่าใด และเอมไซม์ของโนโวไม่ได้แสดงส่วนประกอบที่แน่นอน เนื่องจากส่วนประกอบเหล่านั้น เป็นความลับของแต่ละบริษัท นอกจานี้ ยังเป็นเอมไซม์ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์อีกด้วย

Prescott และ Dunn (28) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ A . niger คือ 28-30 °ซ. การผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี แต่จะมีการสะสมกรดออกซาลิค และ กรดกลูโคนิค (1) จากผลการทดลองที่ 2.3.1 ในการแปรผันอุณหภูมิสำหรับการผลิตกรดมะนาวของ A . nigerA 185 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงสุด 102 กรัม/ลิตรในวันที่ 8 (ตารางที่ 16.1) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงสุด 142 กรัม/ลิตร และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ. (ตารางที่ 16.2) การเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 35 °ซ. เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงสุด 92

กรัม/ลิตร และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด แต่ผลิตกรดมะนาวได้น้อย เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 °ซ. (ตารางที่ 16.3 และรูปที่ 11) จากการทดลองนี้แสดงว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ A .niger A 185 คือ 30 °ซ.

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว จะเจริญและผลิตกรดมะนาวในอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างต่างกัน เช่น ยีสต์จะเจริญในอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง และเมื่อยีสต์ผลิตกรดมะนาว ความเป็นกรด-ด่างของอาหารจะลดลงมากทำให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ดังนั้นในการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตกรดมะนาวจะต้องเติมสารปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลาง (neutralizing agent) เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต เป็นต้น ตามปกติเชื้อราที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวสามารถทนต่อปริมาณกรดที่สร้างขึ้นได้ ซึ่งเมื่อมีการผลิตกรดมะนาว ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการหมักจะลดลงอยู่ในช่วง 1.5-2.0 จึงไม่จำเป็นต้องเติมสารที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลาง (8) แต่ในการหมักจำเป็นต้องปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อราในช่วงแรก จากผลการทดลองที่ 2.3.2 ซึ่งแปรผันความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวของ A . niger A 185 พบว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 5.5 เชื้อราจะผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเท่ากับ 53 และ 82 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 17.1 และ 17.2) แต่น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่ำ ไม่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อราทำให้ผลผลิตกรดมะนาวลดลง เมื่อเพิ่มความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5 และ 6.5 เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 137 และ 102 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 17.3 และ 17.4) ในระหว่างการหมักนั้นความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักจะลดลงเรื่อยๆ โดยเฉพาะในช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาว ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักจะลดลงต่ำสุดและคงที่ในช่วง 1.5-2.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว ถ้าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างการหมักมีค่าสูงกว่า 3 แล้ว เชื้อราจะสร้างกรดอินทรีย์ชนิดอื่น โดยเฉพาะกรดออกซาลิค และ กรดกลูโคนิค ในขณะเดียวกันก็จะผลิตกรดมะนาวน้อยลง (2,4,28)

จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาวของ A . niger A 185 มาก กล่าวคือ เชื้อรานี้จะให้ผลผลิตกรดมะนาวมากที่สุด เมื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.5

ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลวสามารถใช้สปอร์หรือเส้นใยในการเตรียมหัวเชื้อ การเติมสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมะนาวโดยตรงจะยืดระยะเวลาการเจริญเติบโตให้นานออกไปอีก เนื่องจากสปอร์จะต้องใช้เวลาในการเจริญช่วงหนึ่งก่อนจึงเริ่มผลิตกรดมะนาว การย่นระยะเวลาการเจริญของสปอร์ในช่วงแรกทำได้ โดยการเตรียมหัวเชื้อที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของอาหารเหมือนอาหารที่ใช้ในการหมักเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในการหมักได้ดีและรวดเร็ว จากผลการทดลองที่ 2.3.3 จากการแปรผันจำนวนสปอร์เริ่มต้นในหัวเชื้อต่อการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาว พบว่า จำนวนสปอร์เริ่มต้นในหัวเชื้อ $1x10^6$ สปอร์/มล. เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเพียง 87 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 18.1) และกลุ่มสายใยที่ได้มีขนาดมากกว่า 1 มม. ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาวในปริมาณมาก เมื่อเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นในหัวเชื้อเป็น $1x10^7$ และ $1x10^8$สปอร์/มล. เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงสุดคือ 148 และ 115 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 18.2 และ 18.3) ถ้าใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นในหัวเชื้อน้อย การผลิตกรดมะนาวจะล่าช้า เช่น เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นในหัวเชื้อเท่ากับ $1x10^6$ สปอร์/มล. ต้องใช้เวลาถึง 10 วัน จึงจะผลิตกรดมะนาวได้สูงที่สุด ในขณะที่ใช้จำนวนสปอร์ $1x10^7$ และ $1x10^8$ สปอร์/มล. เชื้อ A. niger A 185 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงที่สุดในวันที่ 8 ของการหมัก แต่ถ้าใช้จำนวนมากเกินไป เชื้อราจะใช้อาหารมากเพื่อการเจริญเติบโต จึงทำให้มีสมรรถภาพการผลิตกรดมะนาวลดน้อยลง เช่น การใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นในหัวเชื้อ $1x10^8$ สปอร์/มล.จะผลิตกรดมะนาวได้ 115 กรัม/ลิตร ในขณะที่เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นในหัวเชื้อเท่ากับ $1x10^7$ สปอร์/มล. จะสามารถผลิตกรดมะนาวได้ถึง 148 กรัม/มล. สรุปแล้วการเตรียมเชื้อราที่ใช้เป็นหัวเชื้อที่มีจำนวนสปอร์ต่ออาหารเชื้อที่พอเหมาะ จะเป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งสำหรับการผลิตกรดมะนาวจากเชื้อราโดยกรรมวิธี

การหมักในอาหารเหลว

จากการแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าขวดทดลองตามผลการทดลองที่ 2.3.4 พบว่า เมื่อเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เชื้อรา A. niger A 185 ผลิตกรดมะนาวสูงสุด 89 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 19.1) และเมื่อเพิ่มความเร็วรอบเป็น 250 และ 300 รอบ/นาที เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงสุด 135 และ 109 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 19.2 แล้ 19.3) แต่การเขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบ/นาทีนั้น จะมีสายใยของเชื้อราเกาะอยู่ข้างขวดเป็นจำนวนมาก ทำให้เส้นใยได้รับอาหารไม่ทั่วถึง การผลิตกรดมะนาวจึงลดลง ส่วนการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อาจทำให้เชื้อราได้รับอากาศไม่เพียงพอแก่การเจริญเติบโต ทำให้ผลิตกรดมะนาวได้น้อย จากผลการทดลอง แสดงว่า ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวของ A . niger A 185 ในระดับขวดเขย่า คือ 250 รอบ/นาที

จากผลการทดลองในระดับขวดเขย่า พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวประกอบด้วย แป้งที่ย่อยแล้วปริมาณ 450 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 2.5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 กรัม/ลิตร โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 กรัม/ลิตร และ แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรท 0.3 กรัม/ลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว คือ 30 ^{o}ซ. โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นในหัวเชื้อ $1x10^{7}$ สปอร์/มล. นำสภาวะดังกล่าวมาศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อราสร้างกรดมะนาวได้สูงขึ้น ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ในการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาว จัดเป็นการหมักในสภาพที่มีอากาศ (Aerobic Fermentation) ดังนั้นเชื้อราจึงจำเป็นต้องได้รับอากาศในปริมาณมากพอ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งในระหว่างการหมักนี้สามารถควบคุมปริมาณอากาศได้โดยอาศัยการกวน และการให้อากาศ ทั้งสองระบบนี้จะช่วยให้มีการแผ่กระจายออกซิเจนในน้ำหมัก

ได้ดี ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดของถังหมัก

ตามรายงานของ W . Voraputhaporn และคณะนั้น ได้ทำการเลี้ยงเชื้อรา Aspergillus niger ในถังหมักโดยใช้แป้งละลายน้ำเป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันความเร็วรอบในการกวนตั้งแต่ 600 ถึง 800 รอบ/นาที พบว่า ความเร็วรอบในการกวน 700 รอบ/นาทีช่วยให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงสุด คือ 91.4 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น เชื้อรา Aspergillus niger ผลิตกรดมะนาวได้สูงถึง 106 กรัม/ลิตร (20) จากผลการทดลองในข้อ 3.1 พบว่า เมื่อใช้อัตราการกวน 300 รอบ/นาทีนั้น เชื้อราผลิตกรดมะนาวต่ำมาก คือ ระหว่าง 0-3.2 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 20.1) ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอแก่การเจริญเติบโตทำให้เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้น้อย นอกจากนี้ยังมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในน้ำหมักจนถึงชั่วโมงที่ 144 (รูปที่ 15) เมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงสุดในชั่วโมงที่ 144 (ตารางที่ 20.2) จะเห็นได้ว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ได้มีค่าเพียง 71.6 กรัม/ลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการทดลองในระดับขวดเขย่า เมื่อเพิ่มอัตราการการเป็น 500 รอบ/นาที เชื้อราผลิตกรดมะนาวสูงสุด 55.3 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 20.3) แต่เชื้อรามีการเจริญเติบโตดี มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูง (รูปที่ 17) การเพิ่มอัตราการกวนเพียงอย่างเดียวอาจให้อากาศไม่เพียงพอกับความต้องการของเซลล์ รวมทั้งถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น เป็นถังหมักรุ่นเก่าจึงไม่สามารถกวนในอัตราเร็วที่สูงกว่านี้ได้ ดังนั้นจึงมาพิจารณาการเพิ่มอากาศอีกวิธีหนึ่งคือ การให้อากาศ

จากผลการทดลองที่ 3.2 เมื่อลดอัตราการให้อากาศเหลือ 0.5 ลิตร/ลิตรอาหาร/นาที เชื้อราผลิตกรดมะนาวและกรดทั้งหมดน้อยมาก (ตารางที่ 21.1) เนื่องจากอากาศไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต เมื่อให้อากาศ 1.0 ลิตร/ลิตรอาหาร/นาที เชื้อรา A . niger A 185 ผลิตกรดมะนาวสูงสุดในชั่วโมงที่ 144 คือ 50.4 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 21.2) เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ลิตร/ลิตรอาหาร/นาที เชื้อราสร้างกรดมะนาวสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 คือ 42 กรัม/ลิตร (ตารางที่

21.3) และน้ำหนักเซลแห้งที่ได้มีค่าสูงกว่าน้ำหนักเซลแห้งที่ได้จากการให้อากาศ 0.5 ลิตร/ลิตรอาหาร/นาที ถึง 2 เท่า (รูปที่ 18 และ 20) เชื้อรา Aspergillus niger ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญในช่วงแรก มากกว่าในช่วงที่มีการผลิตกรดมะนาวในปริมาณสูง (28) การเพิ่มอัตราการให้อากาศตั้งแต่เริ่มต้นช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีการใช้สารแหล่งคาร์บอนและสารอื่น ๆ ที่จำเป็นอย่างรวดเร็วเช่นกัน ดังนั้นการที่เชื้อราผลิตกรดมะนาวในปริมาณน้อยอาจเนื่องจากแหล่งอาหารถูกใช้หมดไปก่อนที่เซลล์จะเจริญเติบโตเต็มที่ จากการทดลองนี้ แสดงว่า ข้อมูลที่ได้จากการแปรผันอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ยังไม่เพียงพอที่จะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วน การวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 5 ลิตรยังต้องมีการพิจารณาปัจจัยอื่นๆที่สำคัญอีก เช่น การเพิ่มแหล่งอาหารในช่วงเวลาต่างๆ เป็นต้น

จากการคัดเลือกเชื้อรา Aspergillus niger สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า พบว่า A . niger A 185 ผลิตกรดมะนาวได้ดี ทำให้ผลผลิตกรดมะนาวเพิ่มจาก 106 กรัม/ลิตร เป็น 156 กรัม/ลิตร โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน งานวิจัยนี้สามารถนำแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาถูก มาใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตกรดมะนาวซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาแพงขึ้น ข้อมูลการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าจึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนได้ แต่ข้อมูลของการผลิตกรดมะนาวในถังหมักยังต้องทำการวิจัยต่อไป