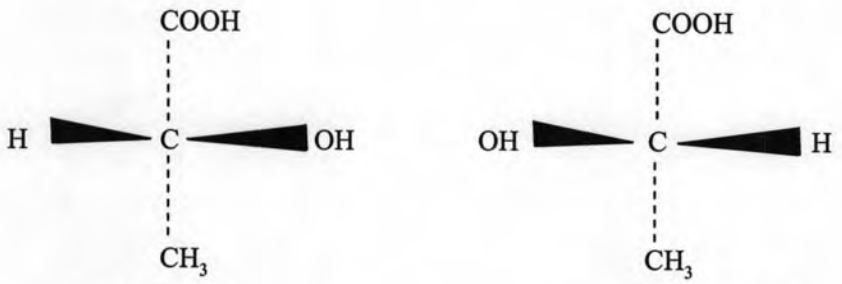
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแลกติก

กรดแลกติก (Lactic acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ชื่อทางเคมีคือ 2-hydroxypropanoic acid มีสูตรทางเคมี คือ $C_3H_6O_3$ กรดแลกติกถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในผลิตภัณฑ์นมในปี ค.ศ.1780 โดยนักเคมีชาวสวีเดน กรดชนิดนี้มี 2 ไอโซเมอร์ คือ กรดดี (-)-แลกติกและกรดแอล (+)-แลกติก (Litchfield, 1996) ซึ่งจะแตกต่างตรงการจับของหมู่ไฮดรอกซีที่มาเกาะตรงตำแหน่งของไครัลคาร์บอนอะตอม แสดงดังรูปที่ 2.1



กรดดี (-)-แลกติก กรดแอล (+)-แลกติก

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดดี (-)-และแอล (+)-แลกติก

จากความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของกรดแลกติกชนิดแอล (+)-ไอโซเมอร์กับชนิดดี (-)-ไอโซเมอร์ ทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างกัน โดยกรดแลกติกชนิดดีแอลแลกติกมีจุดเดือดเท่ากับ 82-85 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลว 16.8-33 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าของกรดดีแลกติกที่มีจุดเดือดเท่ากับ 103 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลว 52.8-53.6 องศาเซลเซียส (Budavari และคณะ, 1989; Honten และคณะ, 1971)

กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี สามารถละลายในน้ำ เอทานอล อะซีโตนและอีเทอร์ได้ แต่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์และคาร์บอนไดซัลไฟด์ (Lockwook, 1965) คุณสมบัติต่างๆของกรดแลกติกแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

ลักษณะของกรดแลกติก	
CAS number	50-21-5, 79-33-4(L), 10326-41-7(D)
EINECS number	200-018-0
สูตร	CH_3CH (OH) COOH
มวลโมเลกุล	90.08
H.S. code	2918.11
Toxicity	Oral rat LD50:3543 mg/kg
Synonyms	2-hydroxypropanoic acid; 1-hydroxyethanecarboxylic acid; Ethylidenelactic acid; Alpha-hydroxypropionic acid
สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี (99%)	
Physical State	Colorless to slightly yellow, syrupy liquid
จุดหลอมเหลว	17 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	122 องศาเซลเซียส
Specific gravity	1.2
Solubility in water	Miscible
NFP Aratings	Health 3, Flammability 1, Reactivity 1
Flash point	112 องศาเซลเซียส
Stability	Stable under ordinary conditions

ที่มา : ดัดแปลงจาก Vaidya และคณะ (2005)

2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก

ด้านอาหาร กรดแลกติกเป็นกรดที่มักพบในผลิตภัณฑ์นม อาหารหมัก มักใช้เป็นสารที่ให้รสเปรี้ยว ปรับค่าพีเอชในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ใช้เป็นสารกันเสีย และป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์

ด้านเภสัชกรรม ช่วยปรับค่าพีเอชและเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ยา ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในการเตรียมไวตามิน เป็นส่วนประกอบของยาเพื่อเพิ่มคุณสมบัติในการละลายน้ำ เป็นสารตัวกลางเพื่อช่วยให้ตัวยาผสมกันได้ดีขึ้น อนุพันธ์ของกรดแลกติกถูกนำมาใช้ในการรักษาโรค เช่น โรคโลหิตจาง โรคขาดแคลเซียมในกระดูกและฟัน เป็นต้น

ด้านเครื่องสำอาง เป็นส่วนผสมในครีมหรือโลชั่นสำหรับทาให้ความชุ่มชื้นกับผิว เป็นสารช่วยในการหลุดลอกของผิวในเครื่องสำอาง ใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวขึ้นโดยจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ควบคุมค่าพีเอชและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

ด้านการฟอกหนังและทอผ้า ใช้ในการฟอกหนังให้นิ่มในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ในอุตสาหกรรมทอผ้าจะช่วยในการย้อมและพิมพ์เพื่อให้สีติดแน่นนานยิ่งขึ้น

ด้านอุตสาหกรรมพลาสติก เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพ (พอลิแลกติกแอซิด) ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เพื่อทดแทนพลาสติกสังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยนำมาใช้ในด้านต่างๆ ได้แก่ วัสดุทางการเกษตรและประมง เช่น ฟิล์มคลุมพืช กระถางต้นไม้ เชือกอวนและแห วัสดุก่อสร้าง เช่น ฉนวนกันความร้อน ผนังกั้นหรือฉุง วัสดุสำนักงาน เช่น ซองเอกสาร แฟ้มใส ปกหนังสือ เป็นต้น ตลอดจนถูกนำมาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร เช่น ถาดอาหารหรือฟิล์มห่อหุ้มอาหาร ผลิตอุปกรณ์เครื่องมือแพทย์ เช่น วัสดุเย็บแผล วัสดุซ่อมแซมกระดูกชิ้นเล็กๆเนื่องจากพลาสติกชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ง่าย

ด้านอื่นๆ ใช้ในการผลิตแลกเกอร์ หมึก ใช้ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด และสารฆ่าเชื้อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น

จากการสำรวจการผลิตกรดแลกติกทั่วโลก พบว่า มีการผลิตกรดแลกติกถึง 130,000-150,00 ตันต่อปี (Wee และคณะ, 2006) และมีแนวโน้มความต้องการสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีราคาประมาณ 1.59 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ที่ความเข้มข้นของกรดแลกติกเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์

2.3 การผลิตกรดแลกติก

2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีของกรดแลกติกในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะสังเคราะห์ผ่าน Lactonitrile โดยนำ HCN มาทำปฏิกิริยากับ Acetaldehyde ได้เป็น Lactonitrile ตามขั้นตอนที่ 1 จากนั้นนำ Lactonitrile ที่ได้มาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริก ได้เป็นกรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ตามขั้นตอนที่ 2

ขั้นตอนที่ 1 :

$$\underset{\text{acetaldehyde}}{CH_3CHO} + \underset{\text{hydrogen cyanide}}{HCN} \xrightarrow{\text{catalyst}} \underset{\text{lactonitrile}}{CH_3CHOHCN}$$

ขั้นตอนที่ 2 :

$$\underset{\text{Lactonitrile}}{CH_3CHOHCN} + H_2O + \underset{\text{sulphuric acid}}{1/2H_2SO_4} \longrightarrow \underset{\text{lactic acid}}{CH_3CHOHCOOH} + \underset{\text{ammonium salt}}{1/2(NH_4)_2SO_4}$$

ขั้นตอนที่ 3 :

$$\underset{\text{lactic acid}}{CH_3CHOHCOOH} + \underset{\text{methanol}}{CH_3OH} \longrightarrow \underset{\text{methyl lactate}}{CH_3CHOHCOOCH_3} + H_2O$$

ขั้นตอนที่ 4 :

$$\underset{\text{methyl lactate}}{CH_3CHOHCOOCH_3} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{lactic acid}}{CH_3CHOHCOOH} + \underset{\text{methanol}}{CH_3OH}$$

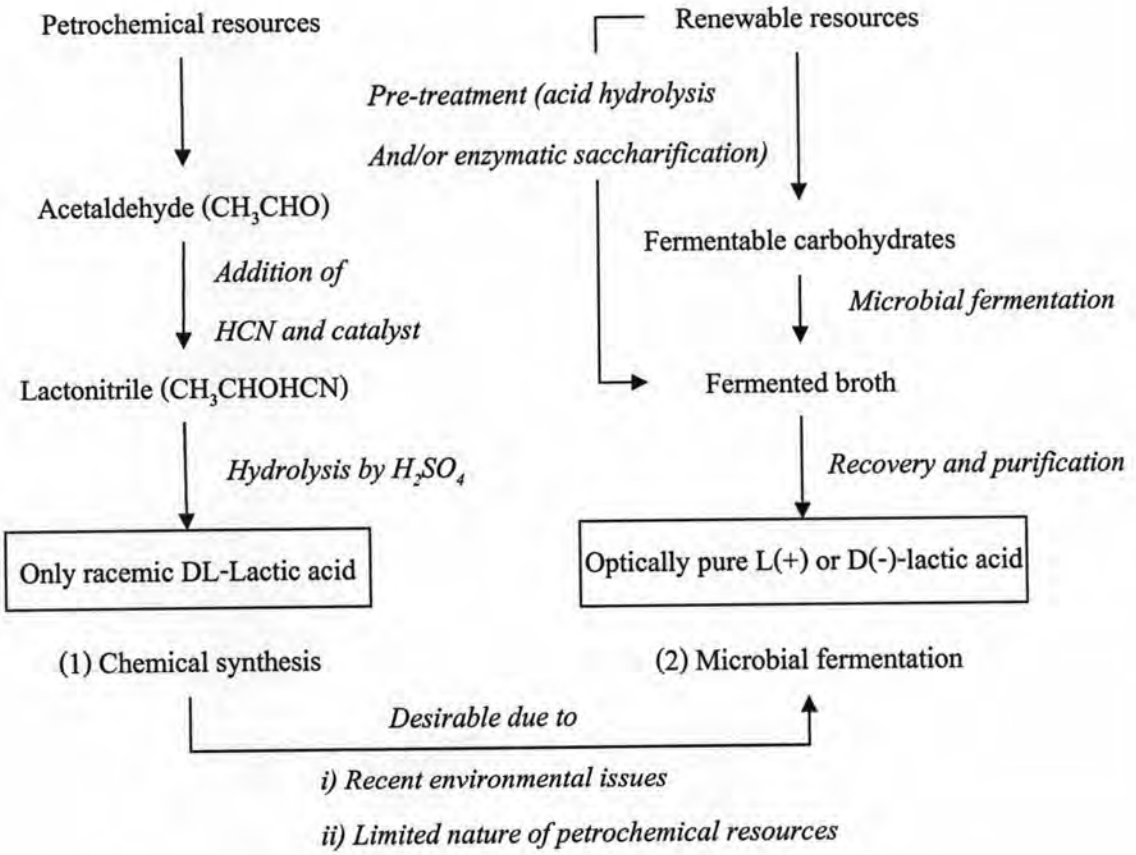
ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

กรดแลกติกที่ได้จะนำมาผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (Esterification) ด้วยเมทานอลได้เป็นเมททิวแลกเตทตามขั้นตอนที่ 3 จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นและผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้เป็นกรดแลกติกและเมทานอลตามขั้นตอนที่ 4

นอกจากนี้กรดแลกติกยังสามารถสังเคราะห์ทางเคมีได้จากกระบวนการอื่นๆ ได้แก่ การสังเคราะห์โดยใช้ Propene เป็นสารตั้งต้น (Vaidya และคณะ, 2005) ปฏิกิริยาการย่อย

สลายน้ำตาลด้วยด่าง (Varadarajan และ Miller, 1999) ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ propylene glycol ปฏิกิริยาระหว่าง Acetaldehyde กับคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำภายใต้อุณหภูมิและความดัน และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Chloropropionic acid เป็นต้น

ซึ่งข้อเสียของการสังเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ การใช้สภาวะรุนแรงในการทำปฏิกิริยา วัตถุดิบที่ใช้ยังเป็นสารเคมีที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ และไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ กรดแลกติกที่ได้ยังอยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสม เนื่องจากกรดแลกติกที่เป็นประโยชน์ทางชีวภาพ สามารถใช้ในอาหารและเภสัชกรรมต้องเป็นกรดแลกติกชนิดแอลฟอร์มเพราะกรดแลกติกชนิดดีฟอร์มไม่สามารถเมแทบอไลซ์ในร่างกายมนุษย์ เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ชนิดดีแลกเตทดีไฮโดรจีเนส เป็นเหตุให้ปริมาณกรดดีแลกติกในเลือดสูง เกิดสภาวะที่เป็นกรดสูง (Hyper-acidity) นอกจากนี้ในการสังเคราะห์พอลิแลกติกแอซิดก็ต้องการกรดแลกติกชนิดแอลฟอร์มในการผลิตพลาสติกชีวภาพคุณภาพสูง เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกโดยการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมัก แสดงดังรูปที่ 2.2



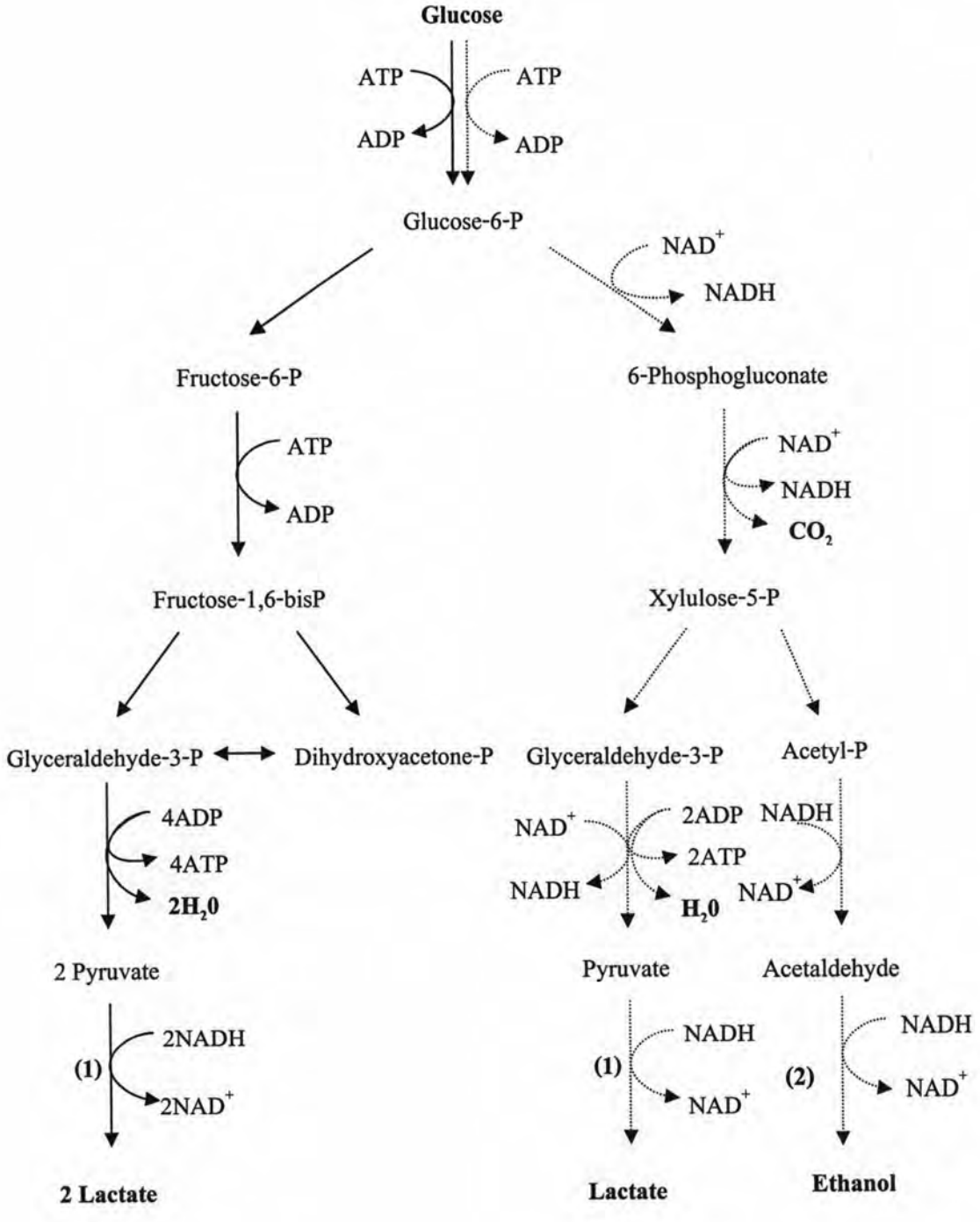
รูปที่ 2.2 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (1) และกระบวนการหมัก (2) ที่มา : Wee และคณะ, 2006

2.3.2 กระบวนการหมัก

2.3.2.1 กระบวนการหมักโดยเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็นโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ คือ จะผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Lactococcus* sp. เป็นต้น อีกกลุ่มคือ แบคทีเรียพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ซึ่งนอกจากจะผลิตกรดแลกติกแล้วยังผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Hofvendahl และ Hahn-Hagerdal, 2000) แสดงดังรูปที่ 2.3

แบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วเข้าวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) โดยการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวทจากนั้นจึงเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นกรดแลกติก พบว่า กลูโคสหนึ่งโมเลกุลสามารถผลิตกรดแลกติกได้สองโมเลกุล ในงานวิจัยของ Michelson และคณะ (2006) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* DSM 20073 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 9.9 และ 5.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้สารอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 126 กรัมต่อลิตร Yeast autolysate 185.7 มิลลิลิตรต่อลิตร KH_2PO_4 0.25 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.024 กรัมต่อลิตร $MgCl_2$ 0.03 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.08 กรัมต่อลิตร และ Microelements solution 2.3 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งพบว่าแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟสามารถเจริญเติบโตได้ในระยะเวลาอันสั้นและผลิตกรดแลกติกได้สูง (Thomas และคณะ, 1979) ซึ่งมีสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hujanen และคณะ, 2001 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *Lactobacillus casei* NRRL B-441 ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 118.6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 160 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการหมัก 15 ชั่วโมง แต่เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการไวตามินและกรดอะมิโนหลายชนิดในการเจริญและไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจำพวกแป้งและเซลลูโลสได้เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์หรือกรดก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักส่งผลให้การผลิตกรดแลกติกมีต้นทุนที่สูง อีกทั้งยังพบว่ากรดแลกติกที่ได้จากแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟนั้นอยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสมหรือกรดแอล (+) และดี (-) แลกติกทำให้เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักจึงต้องแยกไอโซเมอร์ผสมของกรดแลกติกออกจากกันก่อนนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆต่อไป



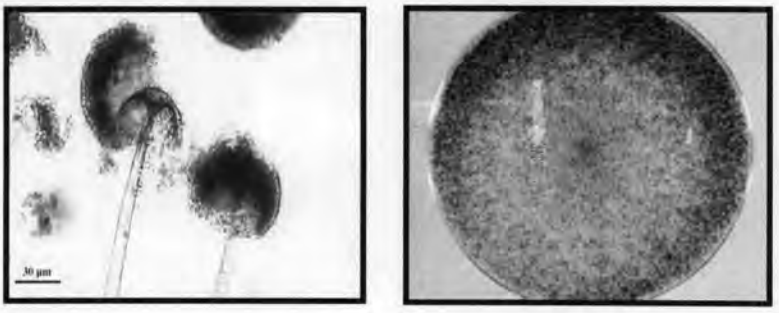
รูปที่ 2.3 เมแทบอลิซึมการผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (เส้นทึบ) และเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (เส้นประ) จากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มา : Wee และคณะ, 2006

หมายเหตุ (P = phosphate, ADP = adenosine 5'-diphosphate, ATP = adenosine 5'-riphosphate, NAD^+ = nicotinamide adenine dinucleotide, NADH = nicotinamide adenine dinucleotide, (1) = lactate dehydrogenase, (2) = alcohol dehydrogenase)

2.3.2.2 กระบวนการหมักโดยเชื้อรา

เชื้อราที่สามารถผลิตกรดแลกติกเป็นเชื้อราที่อยู่ในจีนัส *Rhizopus Mucor* และ *Monilia* เช่น *Rhizopus arrhizus R. Delmar R. elegans R. japonicus R. oryzae R. stolonifer* และ *R. chinensis* เป็นต้น สำหรับการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ *R. oryzae* เนื่องจากเชื้อราสามารถผลิตกรดแอลแลกติกบริสุทธิ์จากแป้ง น้ำตาล รวมทั้งวัสดุการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบรวมทั้งกากน้ำตาลซึ่งมีราคาถูก เนื่องจากเชื้อรามีเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Wee และคณะ, 2006) ในสภาวะที่มีอากาศ สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เช่นเกลือแอมโมเนียมหรือไนเตรต อีกทั้งไม่ต้องการไวตามินหรือกรดอะมิโนเสริมในกระบวนการหมักเหมือนแบคทีเรีย จึงทำให้กระบวนการหมักด้วย *R. oryzae* มีต้นทุนการผลิตทั้งด้านวัตถุดิบและกระบวนการแยกบริสุทธิ์หลังกระบวนการหมักที่ต่ำกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย นอกจากนี้กระบวนการหมักกรดแลกติกจากเชื้อราสามารถผลิตที่อุณหภูมิสูงและพีเอชต่ำ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เชื้อรามีการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ การหมักกรดแลกติกโดยเชื้อราเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในสภาวะที่มีการให้อากาศจะให้กรดแลกติก 1.5 โมลต่อโมลของกลูโคส เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *Lactobacillus* sp. กับ *R. oryzae* ในตารางที่ 2.2

เชื้อรา *R. oryzae* ถูกจัดอยู่ใน Order Mucorales Family Mucoraceae สายใยไม่มีผนังกั้น มีอับสปอร์ลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-350 ไมโครเมตรอยู่ที่ปลายก้านสปอร์ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีน้ำตาลอมดำ สปอร์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-11 ไมโครเมตรลักษณะกลม หรือรูปไข่ (Ellis, 1997) แสดงดังรูปที่ 2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้คือ 5-7 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้คือ 44-49 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.4 ลักษณะของเชื้อรา *R. oryzae* ที่มา : Domsch และคณะ, 1980

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบกระบวนการหมักระหว่าง *Lactobacillus sp.* กับ *R. oryzae*

	Lactobacillus sp.	*R. oryzae*
Substrates medium	can't use starch and pentoses require complex growth nutrients	can use starch and pentoses simple medium composition
Growth conditions	anaerobic, pH > 4.5	aerobic, pH > 3
Products	usually mixtures of L(+) and D(-)-lactic acids	pure L(+)-lactic acid, plus other byproducts (e.g., ethanol,) fumarate, CO_2
Product yield from glucose	0.85 - 0.95 g/g	usually less than ~0.85 g/g
Product concentration	up to 150 g/L	up to ~130 g/L
Productivity	can be as high as 60 g/L·h	usually lower than 6 g/L·h
Reactor operation	Easy	difficult due to the filamentous cell morphology

ที่มา : Thongchul, 2005

งานวิจัยของ Mirdamadi และคณะ, 2002 ได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่างเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (ตารางที่ 2.3) พบว่า สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้สูง ได้แก่ *R. oryzae* PTCC 5263 *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 และ *L. bulgaricus* PTCC 1332 โดยสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. จะผลิตกรดแลกติกที่เป็นไอโซเมอร์ผสมโดยมีกรดดีแลกติกอยู่ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง *R. oryzae* PTCC 5263 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 160 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 4.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เทียบกับ *L. plantarum* PTCC 1058 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 27 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ *L. bulgaricus* PTCC 1332 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ทำการหมักในระดับขวดเขย่าแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่าง *Lactobacillus* sp. กับ *R. oryzae*

Glucose g/L	*R oryzae* PTCC 5263			*L. bulgaricuse* PTCC 1332			*L. plantarum* PTCC 1058		
	Production g/L	Productivity g/L·h	Yield %	Production g/L	Productivity g/L·h	Yield %	Production g/L	Productivity g/L·h	Yield %
40	33	1.37	83.3	35.8	1.50	89.55	38.10	1.60	95.67
60	49	2.00	81.0	51.8	2.20	86.34	55.90	2.33	93.24
80	64	2.60	80.0	76.6	2.10	95.83	77.80	2.40	97.31
100	80	3.30	80.0	89.6	2.00	89.69	89.10	2.80	89.19
120	106	3.40	85.0	76.6	1.60	63.39	100.00	2.10	83.33
140	116	3.80	82.0	63.6	1.33	45.46	66.60	1.40	47.57
160	133	4.00	83.0	50.0	1.00	31.25	42.00	0.87	26.25
180	160	4.10	84.0	30.0	0.62	16.67	27.00	0.56	15.00
200	85	3.50	42.0	17.0	0.35	11.76	15.00	0.31	7.50

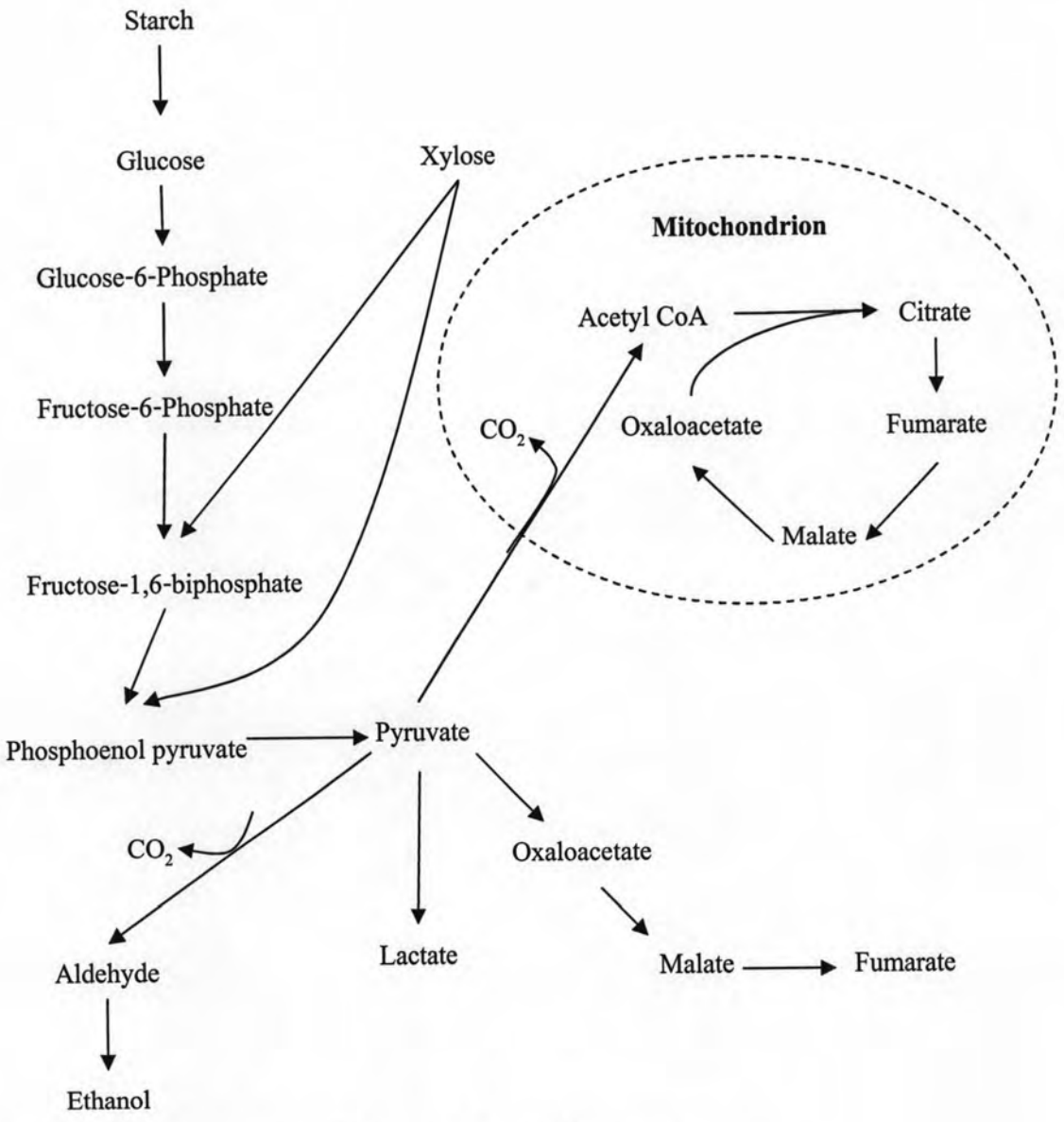
ที่มา : Mirdamadi และคณะ, 2002

2.4 วิถีเมแทบอลิซึมของ *R. oryzae*

จากงานวิจัยของ Wright และคณะ (1996) ศึกษาแบบจำลองวิถีเมแทบอลิซึมของกลูโคส และได้พัฒนาแบบจำลองวิถีเมแทบอลิซึมของเชื้อรา *R. oryzae* จากทฤษฎีการควบคุมวิถีเมแทบอลิซึม (Metabolic control theory) ภายใต้สภาวะคงที่ ด้วยการติดตาม (^{14}C)-กลูโคสในวิถีไกลโคไลซีส และวัฏจักร TCA ดังรูปที่ 2.4 พบว่า เชื้อรา *R. oryzae* สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งอาหารได้โดยตรง เนื่องจากเชื้อรานั้นผลิตเอนไซม์อะไมเลส เพื่อใช้ในการย่อยโมเลกุลของแป้งโดยเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคส จากนั้นจึงเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวท โดยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารตั้งต้นโดยเปลี่ยนไซโลสเป็นไพรูเวทโดยวิถีเพนโตสฟอสเฟต (HMP) ถ้าอยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงเชื้อราจะเปลี่ยนไพรูเวตเป็นแลกเตทด้วย NAD- dependent แลกเตทดีไฮโดรจีเนส (Pritchard, 1973) โดยมี NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ในสภาวะที่ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด หรือเมื่อเชื้อรามีการสร้างสปอร์ ค่าแอกติวิตีของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสจะลดลง จะเกิดการปลี่ยนแลกเตทกลับมาเป็นไพรูเวทได้ด้วย NAD-independent แลกเตทดีไฮโดรจีเนส ดังสมการ

$$\text{Pyruvic acid} + \text{NADH} \underset{\text{NAD-independent lactate dehydrogenase}}{\overset{\text{NAD-dependent lactate dehydrogenase}}{\longleftrightarrow}} \text{Lactic acid} + \text{NAD}^{+}$$

นอกจากนี้ไพรูเวทที่เกิดขึ้นยังถูกนำเข้าสู่วัฏจักร TCA ในไมโตคอนเดรียเพื่อสร้างเซลล์และพลังงาน หรือเปลี่ยนเป็นกรดฟูมาริก ในภาวะที่ถูกจำกัดด้วยอากาศ เชื้อราจะเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทานอลด้วยแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นในการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมัก นอกจากได้กรดแลกติกแล้วยังอาจได้ผลิตภัณฑ์อื่น เช่น กรดฟูมาริก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอลขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการ ดังนั้นการรักษาระดับออกซิเจนที่ละลายภายในถังหมักจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตกรดแลกติก (Bai และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.5 กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสในเชื้อรา *R. oryzae*

ที่มา : Thongchul, 2005

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

2.5.1 สารอาหาร

สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อกระบวนการหมัก เพราะเป็นแหล่งอาหารที่เชื้อต้องการเช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ฟอสเฟต และแร่ธาตุต่างๆที่ใช้สำหรับการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ โดยความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมกับกระบวนการหมักขึ้นกับเชื้อจุลินทรีย์ กระบวนการที่ใช้ในการหมักและชนิดของแหล่งอาหาร

2.5.1.1 แหล่งคาร์บอน

กลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว มีสูตรทั่วไปคือ $C_6H_{12}O_6$ เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เชื้อจึงสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรงไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย่อยก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก กลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวทด้วยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก มีรายงานว่าเชื้อรา *Rhizopus* spp. สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูงจากการใช้แหล่งคาร์บอนจำพวก แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น (Yu และ Hang, 1989) เนื่องจากเชื้อรามีเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยโมเลกุลแป้ง (Wee และคณะ, 2006) จึงสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบโดยไม่ต้องผ่านการย่อย จึงเป็นจุลินทรีย์ที่นักวิจัยให้ความสนใจใช้ในการผลิตกรดแลกติก

Bulut และคณะ (2004) ได้ทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน 5 แหล่งในการผลิตกรดแลกติกได้แก่ กูลโคส ซูโครส กากน้ำตาลจากหัวบีท แครอบพอดและรำข้าวสาลี พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้กูลโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งกากน้ำตาลจากหัวบีทเมื่อผ่านการพลาสเจอร์ไรเซชั่นสามารถผลิตกรดแลกติกได้เพิ่มขึ้นจาก 37 กรัมต่อลิตรเป็น 40 กรัมต่อลิตรและยังพบว่า เมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกเป็น 49 กรัมต่อลิตร พืชท้องถิ่นอย่างแครอบพอดยังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกโดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 58 กรัมต่อลิตร ส่วนรำข้าวสาลีไม่เหมาะสำหรับการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพราะให้ปริมาณกรดแลกติกต่ำเพียง 6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

Ruengruglikit และ Hang (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R.oryzae* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนโดยการหมักในระดับขวดเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 299±6.8 กรัมต่อกิโลกรัมซังข้าวโพดแห้ง ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

Hang (1989) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ในระดับขวดเขย่าโดยใช้ข้าวโพดบดเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่าเฉลี่ยในรูปของ $Y_{P/S}$ ได้ 44 เปอร์เซ็นต์

Jin และคณะ (2005) เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่าง *R. arrhizus* 36017 กับ *R. oryzae* 2062 โดยใช้ของเสียอุตสาหกรรมการผลิตอาหารจากมันฝรั่ง ข้าวโพด ข้าวสาลีและสับปะรด เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นของแป้งหรือน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร พบว่า *R. arrhizus* 36017 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คิดเป็นค่า $Y_{p/s}$ 0.94-0.97 กรัมต่อกรัมของแป้งหรือน้ำตาล ขณะที่ *R. oryzae* 2062 สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่า $Y_{p/s}$ 0.65-0.76 กรัมต่อกรัม

ของแป้งหรือน้ำตาล และยังพบว่าเมื่อเติม $(NH_4)_2SO_4$ สารสกัดจากยีสต์และเปปโตนสามารถเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกขึ้น 8-15 เปอร์เซ็นต์และมีน้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้น 10-20 เปอร์เซ็นต์

2.5.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นสิ่งจำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนได้แก่ เพียวรีน ไพริมิดีน คาร์โบไฮเดรตบางชนิด และโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์บางชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อรา แหล่งไนโตรเจนที่เป็นเกลืออนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย เป็นต้น ส่วนแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เช่น เปปโตน สารสกัดจากยีสต์และน้ำแช่ข้าวโพด เป็นต้น

แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ เปปโตนและน้ำแช่ข้าวโพด (Yin และคณะ, 1997; Zhou และคณะ, 1999; Jin และคณะ, 2003) จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.0 - 4.0 กรัมต่อลิตรถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างแพร่หลายในการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* spp. (Soccol และคณะ, 1994; Yu และ Hang, 1989; Rosenberg และ Kristofikova, 1995; Martak และคณะ, 2003)

Yin และคณะ (1997) ศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมักระบบ Air-lift เมื่อใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมคือ 1.35 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 102 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ 85 เปอร์เซ็นต์ และถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตน้อยกว่า 1.35 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้การเจริญของเชื้อราและการผลิตกรดแลกติกลดลง

Zhang และคณะ (2007) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *R. arrhizous* DAR 36017 และทำการเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (C/N) พบว่า แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้กรดแลกติกสูงสุด โดยผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เอทานอลและกรดฟูมาริกปริมาณน้อย และเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตสูงจะเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกให้สูงขึ้น ส่วนยูเรียจะให้ผลผลิตกรดแลกติกต่ำที่สุด ขณะที่สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตนจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อรามากกว่าการผลิตกรดแลกติก โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรต 0.909 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดแลกติกความเข้มข้น 36.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิต 91 เปอร์เซ็นต์

2.5.1.3 เกลืออนินทรีย์

เกลืออนินทรีย์ถูกใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตกรดแลกติก ซึ่งส่วนใหญ่ที่ใช้ได้แก่ KH_2PO_4 $MgSO_4$ $ZnSO_4$ และ $Fe_2(SO_4)_3$ เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปมักจะใช้ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.15 – 0.60 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 0.15 – 0.75 กรัมต่อลิตร $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่ความเข้มข้น 0.04 – 0.09 กรัมต่อลิตรและ $Fe_2(SO_4)_3$ ถูกใช้ในปริมาณต่ำเพียง0.01 กรัมต่อลิตรก็เพียงพอต่อการผลิตกรดแลกติกของ *Rhizopus* spp. (Martak และคณะ, 2003; Woiciechowski และคณะ, 1999) จากงานวิจัยของ Zhou และคณะ (1999) พบว่า ไม่จำเป็นต้องเติม Fe^{2+} ในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ *R. oryzae* เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ KH_2PO_4 เริ่มต้นจาก 0.2 เป็น 1.6 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อผลผลิตกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์ Wang และคณะ (2005) รายงานว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ KH_2PO_4 จาก 0.1 เป็น 0.6 กรัมต่อลิตรส่งผลให้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกลดลงจาก 85 เป็น 71 กรัมต่อลิตรและปริมาณของกรดฟูมาริกลดลงจาก 1.36 เป็น 0.18 กรัมต่อลิตร แสดงว่าปริมาณของ KH_2PO_4 ที่ใช้ในกระบวนการหมักมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก นอกจากนี้ *R. oryzae* ยังต้องการฟอสเฟตในช่วงของการเจริญ

2.5.2 สัณฐานวิทยา

ในกระบวนการหมักในอาหารเหลวลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราจะถูกกำหนดโดยสภาวะแวดล้อมภายในถังหมัก เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน เป็นต้น ลักษณะทางสัณฐานทั่วไปของเชื้อราแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ Disperse mycelia และ Pellets (รูปที่ 2.6) ซึ่ง Disperse mycelia ยังแบ่งเป็น Freely disperse และ Mycelial clumps โดย ลักษณะการเจริญแบบ Freely disperse ประกอบไปด้วยเส้นใย (Hyphal) มากกว่า 3 สาย มาเรียงซ้อนทับกัน ซึ่งลักษณะการเรียงแบบนี้นับเป็น 1 Loop เมื่อเส้นใยมาเรียงซ้อนทับกันมากกว่า 3 Loop เรียกว่า Clumps หรือ การเจริญแบบกลุ่มก้อน ซึ่งตารางที่ 2.4 แสดงลักษณะสัณฐานแบบต่างๆของเชื้อรา *R. oryzae* ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

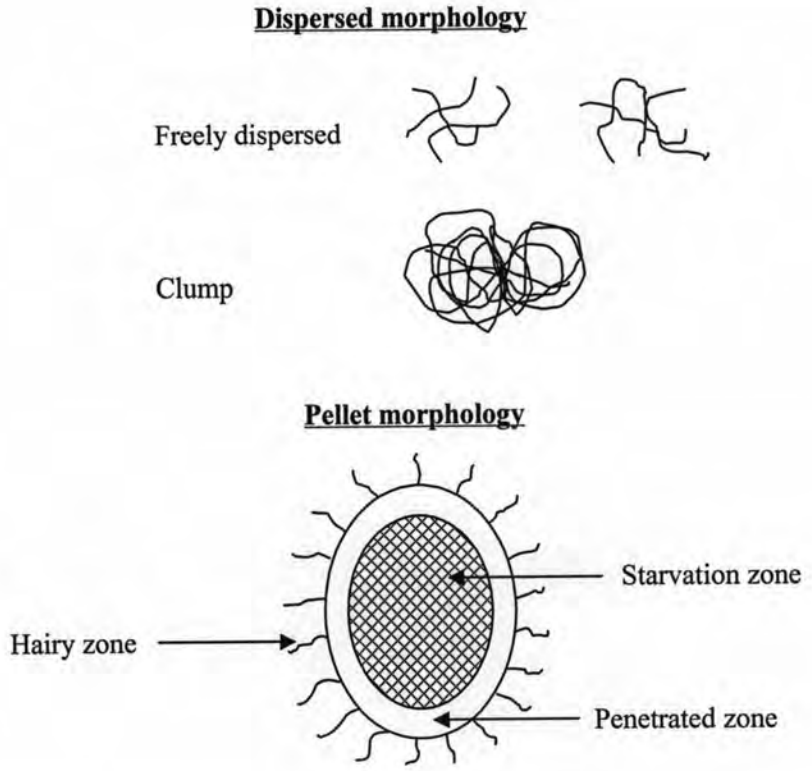
ลักษณะการเจริญแบบ Pellets แบ่งได้เป็น

The outer zone หรือ Hairy zone เป็นส่วนที่อยู่บริเวณรอบนอกของ Pellets มีลักษณะคล้ายขน ซึ่งขนเหล่านี้ทำหน้าที่ในการดูดซึมแร่ธาตุอาหารและอากาศเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์และผลิตกรดแลกติก

Penetrated zone เป็นโซนที่อยู่ถัดเข้ามาอีกชั้นของ Pellets ในโซนนี้แร่ธาตุอาหารและอากาศสามารถซึมผ่านเข้าถึงเซลล์ได้ ทำให้เซลล์เกิดกิจกรรมในการผลิตสารเมแทบอลิซึม ซึ่ง

ขนาดของโซนขึ้นกับ ความหนาแน่นของ Pellets อัตราการเจริญและความเข้มข้นของอากาศที่ละลายในอาหาร

Starvation zone เป็นโซนที่อยู่บริเวณด้านในสุดของ Pellets ที่โซนนี้แร่ธาตุอาหารและอากาศไม่สามารถซึมผ่านเข้าถึงเซลล์บริเวณนี้ได้ทำให้เซลล์ถูกจำกัดในเรื่องของการถ่ายเทอาหารและอากาศ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเซลล์จะผลิตผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เอทานอล และเกิด Autolysis (Cui และคณะ 1998)



รูปที่ 2.6 ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา
ที่มา : ดัดแปลงจาก Thongchul, 2005

ตารางที่ 2.4 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

Morphology	Process	Cultivation system	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Concentration (g/L)	Reference
Cotton flocs	Batch	ALR	87	1.8	104.6	Park และคณะ (1998)
Cotton flocs	Batch	STR	86	1.7	103.6	Kosakai และคณะ (1997)
Small pellets	Batch	BCR	88	2.58	83	Zhou และคณะ (1999)
Small pellets	Repeated batch	ALR	-	1.07	85.7	Yin และคณะ (1998)
Small pellets	Repeated batch	STR	62–74	2.9-6.2	60	Yang และคณะ (1995)
Small pellets	Repeated batch	STR	74.2	-	74.92	Bai และคณะ (2003)
Filamentous	Semicontinuous	STR	75.3	2.91	--	Martak และคณะ (2003)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Zhang และคณะ (2007)

หมายเหตุ ALR : Air-lift reactor

BCR : Bubble column reactor

STR : Stirred tank reactor

Du และคณะ (1998) พบว่าลักษณะของเส้นใยของ *R oryzae* ในถังหมักแบบ Bubble column ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง มี 2 แบบ คือการเจริญแบบ Filamentous และแบบ Pellet ซึ่งการเกิดลักษณะรูปร่างของเส้นใยขึ้นกับค่าพีเอชเริ่มต้นและการเติม $CaCO_3$ เมื่อค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เส้นใยของเชื้อราเจริญเป็นแบบ Filamentous และสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 62.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.46 กรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 27 ชั่วโมง ส่วนอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 เส้นใยของเชื้อราเจริญเป็นแบบ Pellet โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 66 กรัมต่อลิตรคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.46 กรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 43 ชั่วโมง

Bai และคณะ (2003) รายงานว่า ลักษณะสัณฐานแบบ Pellet นั้นเกิดในขั้นตอนของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นจากการหมักในระดับระดับขวดเขย่าของเชื้อรา *R. oryzae* โดยมีปัจจัยที่ก่อให้เกิด Pellet ได้แก่ การเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยในถังกวน เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (Martak และคณะ, 2003) ดังนั้น เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมากเกินไปจึงทำให้ส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะไปอยู่บริเวณด้านล่างของขวดเมื่อเซลล์เจริญเซลล์จะไปเกาะกับแคลเซียมคาร์บอเนตทำให้ลักษณะของเซลล์มีการเจริญแบบกลุ่มก้อน (Clump) และขนาดของ Pellet ที่เกิดขึ้นภายในถังหมักนั้นจะขึ้นกับรอบการกวนและอัตราการให้อากาศ Yang และคณะ (1995) พบว่า ลักษณะสัณฐานแบบ Pellet ที่มีขนาดเล็กในถังกวนนั้นเกิดจากการใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในระหว่างของขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อในการหมักในระดับขวดเขย่า Martak และคณะ (2003) พบว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกลดลงจาก 2.91 เป็น 1.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและการผลิตกรดแลกติก คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ ลดลงจาก 75.3 เป็น 62.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อลักษณะสัณฐานของเชื้อรา *R. arrhizus* เปลี่ยนเป็นแบบ Pellet หลังจากการหมักที่ 152 ชั่วโมงในการหมักระบบ Periodical bleed and feed

Liu และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* NRRL 395 ที่มีลักษณะการเจริญแบบ Clump เทียบกับการเจริญแบบ Pellet ในถังกวนขนาด 5 ลิตร พบว่า ลักษณะการเจริญแบบ Clump สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 33 กรัมต่อลิตร ส่วนเซลล์ที่มีการเจริญแบบ Pellet สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 60 กรัม เมื่อทำการหมัก 2.5 วัน ที่ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 7.0±0.1 ด้วย 20 เปอร์เซ็นต์ ของ $Ca(OH)_2$ และอุณหภูมิที่ใช้คือ 27 องศาเซลเซียส

2.5.3 การตรึงเซลล์

กระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยของ *R. oryzae* ในถังกวนมักจะประสบปัญหาเรื่องการถ่ายเทอากาศและอาหารภายในถังหมักซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของเชื้อรา และลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักจะมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก เพื่อกำจัดปัญหาเรื่องการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา (Znidarsic และ Pavko, 2001) การยึดตรึงเซลล์จึงถูกนำมาใช้ในการควบคุมสัณฐานของเชื้อรา นอกจากนี้ยังพบว่า การตรึงเซลล์ยังสามารถช่วยเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติก และการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ภายในถังหมักยังทำได้สะดวกเมื่อเทียบกับกระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอย แสดงดังตารางที่ 2.5 และ 2.6 ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการยึดตรึงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก แสดงในตารางที่ 2.7 และ 2.8

Hamamci และ Ryu (1994) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเทคนิคตรึง *R. oryzae* ด้วย Alginate ในถังหมักแบบ fluidized-bed โดยทำการหมักแบบไม่เนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 73 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 64.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการหมักนาน 44.5 ชั่วโมง และใช้กลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

Sankpal และคณะ (2001) ได้ทำการคัดแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนจากดินและนำมาตรึงบน Cellulose microfibrils โดยเปรียบเทียบการหมักด้วยเซลล์แขวนลอยกับเซลล์ตรึงในระดับขวดเขย่าโดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า การหมักด้วยเซลล์ตรึงสามารถผลิตเดกซ์แทรนได้สูงสุด 14 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเดกซ์แทรนเท่ากับ 0.4 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมงและการหมักด้วยเซลล์แขวนลอยสามารถผลิตเดกซ์แทรน 11 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเท่ากับ 0.28 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง

Efremenko และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยการตรึง *R. oryzae* บน Poly(vinyl alcohol)-Cryogel ในถังหมัก โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 112 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและเมื่อทำการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 173 กรัมต่อลิตร

Ganguly และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีตรึงเซลล์ *R. oryzae* RBU2-10 บนใยบวบ โดยใส่ใยบวบขนาด 1.008 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 4 ชิ้นต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 3×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 80.75 กรัมต่อลิตรเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.66 – 1.84 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ 2.5 การหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยในระดับขวดเขย่า

Fermentation conditions	Substrate	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Concentration (g/L)	Operation period	Reference
Free cell in shake flask	Wastepaper	0.59 g/g	16.3 g/L·d	49.1	Batch	Park และคณะ (2004)
Free cells in shake flask	Potato wastewater	78.4-87.4	0.57-0.98	21.25	Batch process	Huang และคณะ (2005a)
Free cells (mutants with low ADH) in shake flask under low O_2	Glucose 100 g/L	-	-	40	Batch, 70 h	Skory และคณะ (1998)
Free cells with simultaneous saccharification and fermentation in shake flask	Potato wastewater	45	-	21	Batch:saccharification 20 h and fermentation 28 h	Huang และคณะ (2003)

ตารางที่ 2.6 การผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการหมักโดยเซลล์แขวนลอยในถังกวน

Fermentation conditions	Substrate	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Concentration (g/L)	Operation period	Reference
Free cells in air-lift bioreactor	Corn starch 120 g/L	85	-	102	-	Yin และคณะ (1997)
Free cells (pellet) in air-lift bioreactor	Corn starch 90 g/L	75.8 (cycle 1-6)	2.02 (cycle 1-6)	91 (cycle 1-6) 76 (cycle 7-9)	9 repeated batches, 14 days	Yin และคณะ (1998)
Free cells in bubble column bioreactor	Glucose 94 g/L	88	2.58	83	Batch, 32 h	Zhou และคณะ (1999)
Free cells in stirred tank bioreactor with a periodical bleed and feed (PBF)	Glucose 100 g/L	67.3	2.31 kg/m3·h	~80	14 PBF cycles, 10 days	Martak และคณะ (2003)
Free cells (pellet) in stirred tank bioreactor	Glucose 100 g/L	74.2	-	74.92	6 repeated batches	Bai และคณะ (2003)

ตารางที่ 2.7 การหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในระดับขวดเขย่า

Fermentation conditions	Substrate	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Concentration (g/L)	Operation period	Reference
Immobilized cells in loofa sponge in shake flask	Rice starch containing 12% reducing sugar	_	1.66-1.84	80.75	10 cycles	Ganguly และคณะ (2007)
Mycelial flocs entrapped in mineral supports in shake flask	Glucose 120 g/L	80	-	103.6	Batch, 60 h	Kosakai และคณะ (1997)
Immobilized cells in polyurethane foam cubes in shake flask	Glucose 50 g/L	-	-	~30	12 repeated batches	Sun และคณะ (1998)

ตารางที่ 2.8 การยึดตรึงเซลล์เชื้อรา *R. oryzae* ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

Carrier	Process	Substrate	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Concentration (g/L)	Reference
Calcium alginate	Repeated batch	Glucose	72	2.5	62	Hang และคณะ (1989)
Calcium alginate	Batch	Glucose	65	1.6	73	Hamamci และ Ryu (1994)
Calcium alginate	Continuous	Glucose	71	-	71.5	Xuemei และคณะ (1999)
Rotating disc	Batch and continuous	Glucose	70	-	-	Lin และคณะ (1998)
Polyurethane foam	Repeated batch	Glucose	78	4.6	40	Dong และคณะ (1996)
Cotton like flocs	Batch	Glucose	87	-	104.6	Park และคณะ (1998)
Polyurethane foam	Continuous	Glucose	-	6.2	-	Sun และคณะ (1999)
Polymer support	Batch	Glucose	65	-	-	Tamada และคณะ (1992)
Cotton cloth	Repeated batch	Starch	100	1.65	127	Tay และ Yang (2002)
	and fed-batch	Glucose	90	2.5	226	
Poly(vinyl alcohol)-cryogel	Batch	Glucose	94	5.0	112	Efremenko และคณะ (2006)
	Semi-batch	Glucose	78	2.8	173	

ที่มา : ดัดแปลงจาก Zhang และคณะ (2007)

2.5.4 พีเอช

พีเอชเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกคือ 5.0 – 6.0 (Huang และคณะ, 2003) Tay และ Yang (2002) รายงานว่า ปริมาณของกรดแลกติก เอทานอลและกรดฟูมาริกจะลดลงเมื่อค่าพีเอชลดลงจาก 6.0 เป็น 4.0 ซึ่ง Miura และคณะ (2003) สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 93 กรัมต่อลิตรที่พีเอช 6.0 – 6.5 Rosenberg และ Kristofikova (1995) พบว่า ค่าพีเอชในช่วง 4.8-6.0 ไม่มีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นเช่นกรดมาลิกและกรดฟูมาริก เป็นต้น

Dominguez และ Vazquez (1999) ศึกษาค่าพีเอชในการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ในช่วง 3.5-6.0 ด้วยการหมักในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 71.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 71 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.75 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการหมัก 96 ชั่วโมง และพบว่า ค่าพีเอชในช่วง 3.5-6.0 ของการหมักไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในการผลิตกรดแลกติก

Miura และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเชื้อกลายพันธุ์ *Rhizopus* sp. MK-96-1196 ในถังหมักแบบ Air-lift โดยใช้แป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยได้เปรียบเทียบค่าพีเอชในช่วง 4.5-6.5 พบว่า ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 93 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.60 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเทียบกับที่ค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 สามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Yu และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *R. oryzae* ในถังกวน แบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้กลูโคส 125 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ค่าพีเอชในช่วง 4.3-4.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 109 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดแลกติก 2.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 4.52 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมัก 40 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อค่าพีเอชที่มากเกิน 4.5 นั้นส่งผลให้อัตราการผลิตกรดแลกติกนั้นสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ดีที่สภาวะนี้ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้และค่า $Y_{P/S}$ มีค่าลดลง

2.5.5 การให้อากาศ

อากาศเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตกรดแลกติกเนื่องจากเชื้อรา *R. oryzae* เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ Tay และ Yang (2002) ได้ใช้เทคนิคการตรึงเซลล์ในถังหมักแบบ Rotating fibrous-bed (RFB) เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนภายในถังหมัก พบว่า ค่าการ

ละลายของออกซิเจน (DO) เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 82.8 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เทียบกับค่าการละลายของออกซิเจนเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 49.7 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อค่าพีเอชภายในถังหมักเท่ากับ 5 ซึ่งค่าการละลายของออกซิเจนในช่วง 70-90 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้ค่า $Y_{P/S}$ ของกรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงและเมื่อเพิ่มค่าการละลายของออกซิเจนภายในถังหมัก พบว่าปริมาณกรดแลกติกสูงขึ้นและปริมาณเอทานอลลดลง และเมื่อค่าพีเอชเท่ากับ 6 ที่ค่าการละลายของออกซิเจนเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 18.8 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.32 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเทียบกับที่ค่าการละลายของออกซิเจนเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 7.4 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Bai และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* R1021 ในถังกวน เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศในช่วง 0-1.2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที มีผลทำให้ขนาดของเชื้อราเพิ่มขึ้นแต่จำนวนต่อหน่วยปริมาตร (Number per Unit volume) ลดลง ซึ่งขนาดเฉลี่ยของเชื้อราเท่ากับ 1.4 มิลลิเมตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 76.20 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.60 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

2.5.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก Huang และคณะ (2003) พบว่า เชื้อรา *R. arrhizus* DAR 36017 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 22 ถึง 38 องศาเซลเซียส โดยกรดแลกติกจะถูกผลิตได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่น้ำหนักเซลล์กลับลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม Liu และคณะ (2005) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* NRRL 395 คือ 27 องศาเซลเซียส เมื่อใช้มันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งอุณหภูมิที่นิยมใช้ในงานวิจัยอยู่ในช่วง 27 – 35 องศาเซลเซียส (Zhou และคณะ, 2000; Huang และคณะ, 2005b; Efremenko และคณะ, 2006)

Liu และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* โดยใช้เซลล์ที่มีลักษณะการเจริญแบบ Pellet ในถังกวน ที่อุณหภูมิระหว่าง 27 กับ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ทั้ง 2 อุณหภูมิให้ผลผลิตกรดแลกติก 72 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 4 วัน เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่า เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 62 กรัมต่อลิตร เทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 52 กรัมต่อลิตร

2.5.7 ระบบการหมัก

ระบบการหมักมีความสำคัญในการผลิตกรดแลกติก (ตารางที่ 2.9) เนื่องจากระบบการหมักมีความสัมพันธ์กับสารอาหารและปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้

Soccol และคณะ (1994) ได้คัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus* sp. จำนวน 19 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร พบว่า สายพันธุ์เชื้อรา *R. oryzae* NRRL 395 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 65 กรัมต่อลิตรและผลิตผลิตภัณฑ์อื่นได้แก่ กรดฟูมาริก 4 กรัมต่อลิตรและเอทานอล 4 กรัมต่อลิตร โดยการหมักแบบขวดเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส แบบไม่ต่อเนื่อง

Park และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากของเหลือที่ได้จากสำนักงาน (Waste office) ได้แก่ กระดาษ จากนั้นนำกระดาษมาผ่านกระบวนการย่อย ก่อนนำมาเป็นวัตถุดิบในการหมัก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ในระดับขวดเขย่า พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 49.1 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 59 เปอร์เซ็นต์

Efremenko และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 112 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 5.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

Xuemei และคณะ (1999) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* ทำการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักแบบ Fluidized-bed พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 91.5 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 71 เปอร์เซ็นต์

Sun และคณะ (1999) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* ทำการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักแบบ Air-lift พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 40-60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.0-6.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 61 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

Tay และ Yang (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมักแบบ Rotating fibrous-bed แบบ Fed-batch โดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดได้สูงถึง 127 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Liu และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ทำการหมักในถังกวนแบบ Fed-batch พบว่า เมื่อทำการหมัก 2 วัน สามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร เมื่อปริมาณของกลูโคสหมดจึงได้เติมกลูโคสปริมาตร 80 กรัมกับแป้ง PDB ปริมาตร 12 กรัมลงไปในถังหมักเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 2.5 กับ 3.5 วัน และเมื่อทำการหมัก 5.5 วัน สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดถึง 92 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.53 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 27 องศาเซลเซียสและค่าพีเอชเท่ากับ 7.0±0.1 ด้วย 20 เปอร์เซ็นต์ ของ $Ca(OH)_2$

Yin และคณะ (1998) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก จากแป้งข้าวโพดความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร โดย *R. oryzae* NRRL 395 ทำการหมักแบบ Repeated Batch ในถังหมักแบบ Air-lift พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 91 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 75.8 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Yang และคณะ (1995) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *R. oryzae* NRRL 395 ทำการหมักแบบ Repeated Batch ในถังกวน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 60 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 62-72 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.9-6.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ 2.9 การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบต่างๆ ด้วยเชื้อแบคทีเรีย

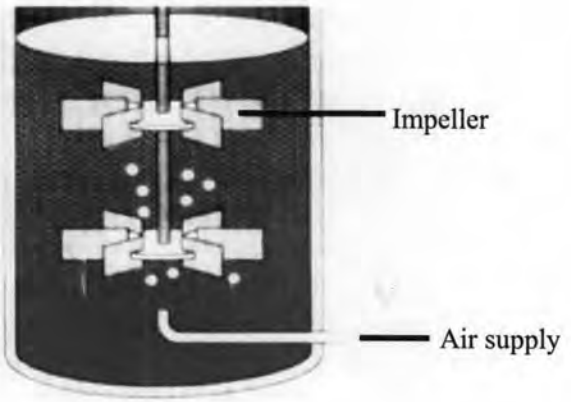
Organism	Fermentaton mode	Lactic acid (g/L)	Productivity (g/L·h)	Reference
Lactobacillus casei Su No 22 + *Lactococus lactis* WS 1042	Fed-batch, coimmobilization	47.0	2.0	Roukas และ Kotzekidou, 1998
L. rhamnosus ATCC 10863	Batch	~120.0	2.1	Kwon และคณะ, 2001
	Continuous, cell-recycle	92.0	57.0	
L. casei ssp. ATCC 11443	Continuous, cell-recycle *via* immobilization	22.4	9.0	Cotton และคณะ, 2001
L. delbrueckii NRRL B445	Fed-batch, in situ removal	~23.1	0.2	Iyer และ Lee, 1999
L. helveticus CNRZ 303	Continuous, cell-recycle *via* membrane	55.0	7.1	Jeantet และคณะ, 1996

ที่มา : Wee และคณะ 2006

2.5.8 ชนิดของถังหมัก

ถังหมักเป็นส่วนประกอบหลักในการใช้จุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารชีวภาพที่มีประโยชน์ ถังหมักที่ถูกออกแบบอย่างเหมาะสมต้องสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อม เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิภายในถังหมักได้ สามารถรักษาสภาวะปลอดเชื้อ (Sterile condition) และให้การกวนผสมที่มีประสิทธิภาพ ถังหมักที่นิยมในการผลิตกรดแลกติก ได้แก่

ถังกวน (Stirred-tank reactor) ลักษณะของถังหมัก นิยมทำด้วยแก้ว ที่ด้านข้างของถังหมักจะมี Baffle ติดตั้งอยู่โดยทั่วไปจะมีอยู่ 4 อัน เพื่อป้องกันการเกิด Vortex ซึ่งเกิดจากการหมุนของใบพัดที่ความเร็วรอบสูง ใบพัดของถังกวนอาจติดตั้งอยู่ด้านบนหรือด้านล่างของตัวถังหมัก ซึ่งอัตราส่วนความกว้างของใบพัดต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมักเป็น 1:10 ถึง 1:12 แสดงดังรูปที่ 2.7 ให้อากาศทางด้านล่างของถังหมัก ข้อดีของถังหมักชนิดนี้คือ ค่าดำเนินการต่ำ และกระบวนการหมักสามารถทำได้ง่าย แต่เนื่องจากลักษณะเส้นใยของเชื้อราที่มีการเจริญแบบ Freely disperse mycelia จะก่อให้เกิดปัญหาในการควบคุมระบบในการหมัก เนื่องจากเซลล์ไปเกาะที่บริเวณมาตรวัดค่าพีเอช (pH sensor) และมาตรวัดออกซิเจนที่ละลาย (DO Probe) อีกทั้งค่าการละลายของออกซิเจนต่ำลงและเกิดปัญหาในการกวนภายในถังหมัก



รูปที่ 2.7 ลักษณะของถังกวน (Stirred-tank reactor) ที่มา : Thongchul, 2005

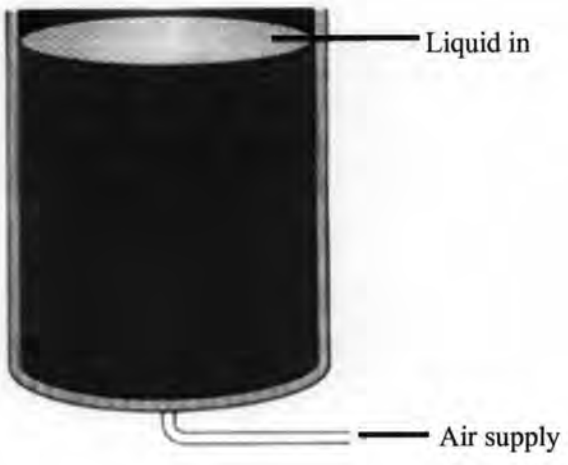
Martak และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* ในถังกวน สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง 80 กรัมต่อลิตร เป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 67.3 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.31 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง ใช้กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการหมักแบบ Periodical bleed and feed (PBF)

Bai และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* R1021 ในถังกวน สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง 74.92 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 74.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

Hang และคณะ (1989) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* ที่ถูกตรึงด้วย Calcium alginate ในถังกวน สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง 62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 130 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

Zhang และคณะ (2008) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *R. arrhizus* ในถังกวนเพื่อผลิตกรดแลกติก รวมถึงศึกษาข้อจำกัดของการถ่ายเทอาหารและการกวนที่เป็นปัญหาจากสัณฐานของเชื้อราในรูปกลุ่มก้อนในถังกวน พบว่า การใช้กรดไฮโดรคลอริกเพื่อปรับค่าพีเอชในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นนั้นสามารถควบคุมลักษณะสัณฐานของเชื้อราได้ โดยลักษณะสัณฐานของเชื้อราแบบ Pellet สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 85.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ของเหลือที่ได้จากการผลิตแป้งมันฝรั่ง (Waste potato starch) เป็นแหล่งอาหาร

ถังหมักแบบ Packed bed ลักษณะของถังหมักชนิดนี้ คือ ให้อากาศเข้าทางด้านล่างของถังหมัก ส่งผลให้เกิดการไหลวนด้วยแรงดันของอากาศ ค่าแรงเฉือนจึงต่ำเนื่องจากไม่มีใบพัด และมีพื้นที่ไว้สำหรับให้เซลล์ยึดเกาะ ภายในมีลักษณะเป็นช่อง จึงเกิดการตรึงเซลล์ภายในช่องดังกล่าว (รูปที่ 2.8) ถังหมักแบบนี้มักมีปัญหาเรื่องการควบคุมขนาดของเซลล์ทำให้เกิดการจำกัดการถ่ายเทอากาศภายในเซลล์



รูปที่ 2.8 ลักษณะของถังหมักแบบ Packed bed ที่มา : Thongchul, 2005

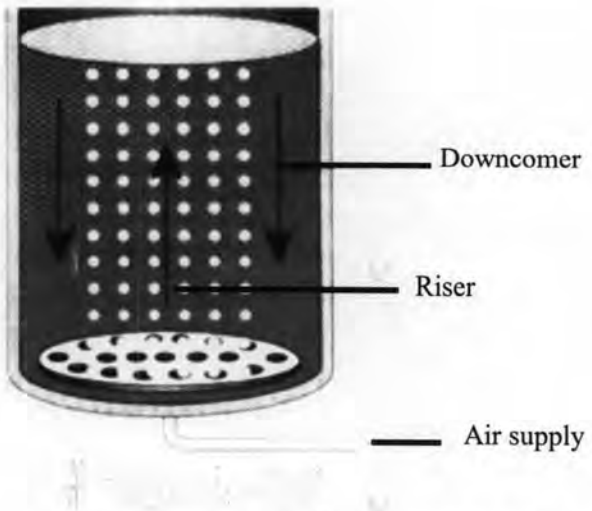
Sirisansaneeyakul และคณะ (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเทคนิคการตรึงเซลล์ *Lactococcus lactis* IO-1 แบบ microencapsulated ในถังหมัก Packed

bed แบบ Repeated Batch พบว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 4.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กูลโคส 45 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากเนื้อ 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 7.5 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอาหาร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.85 และ 37 องศาเซลเซียส

ถังหมักแบบ Air-lift หลักการทำงานจะอาศัยความแตกต่างของความถ่วงจำเพาะของของเหลวเมื่อมีอากาศผสมอยู่ในปริมาตรแตกต่างกัน การส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่ของเหลวในถังหมักเกิดขึ้นจากแรงดันของของเหลวภายในถังหมัก โดยเกิดมากสุดบริเวณฐานของถังหมัก และน้อยลงตามลำดับความสูงที่เพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 2.9

Yin และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Rhizopus* sp.จำนวน 8 สายพันธุ์และเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้ในการหมักด้วยระบบ Air-Lift โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 102 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ในถังหมักขนาด 3 ลิตร

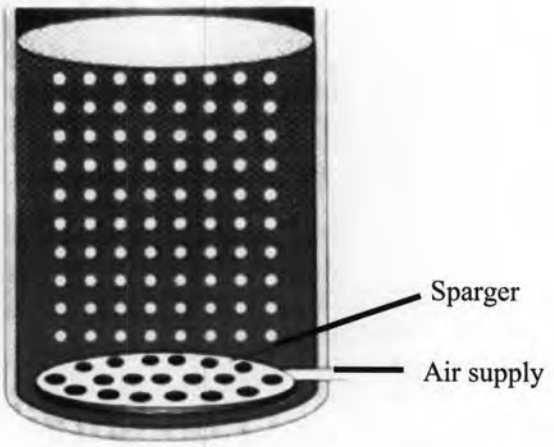
Park และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมัก Air-lift แบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 104.6 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 2.9 ลักษณะของถังหมักแบบ Air-lift ที่มา : Thongchul, 2005

Miura และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Rhizopus* sp. MK-96-1196 ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ด้วยระบบ Air-Lift เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นวัตถุดิบในการหมัก พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 90 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ถังหมักแบบ Bubble column ลักษณะการทำงานคล้ายถังหมักแบบ Air-lift คือมีการให้อากาศทางด้านล่างของถังหมัก แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 ลักษณะของถังหมักแบบ Bubble column ที่มา : Thongchul, 2005

Zhou และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* ATCC 52311 ในถังหมักแบบ Bubble column พบว่า ผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 83 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตแลกติกเท่ากับ 2.58 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 94 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

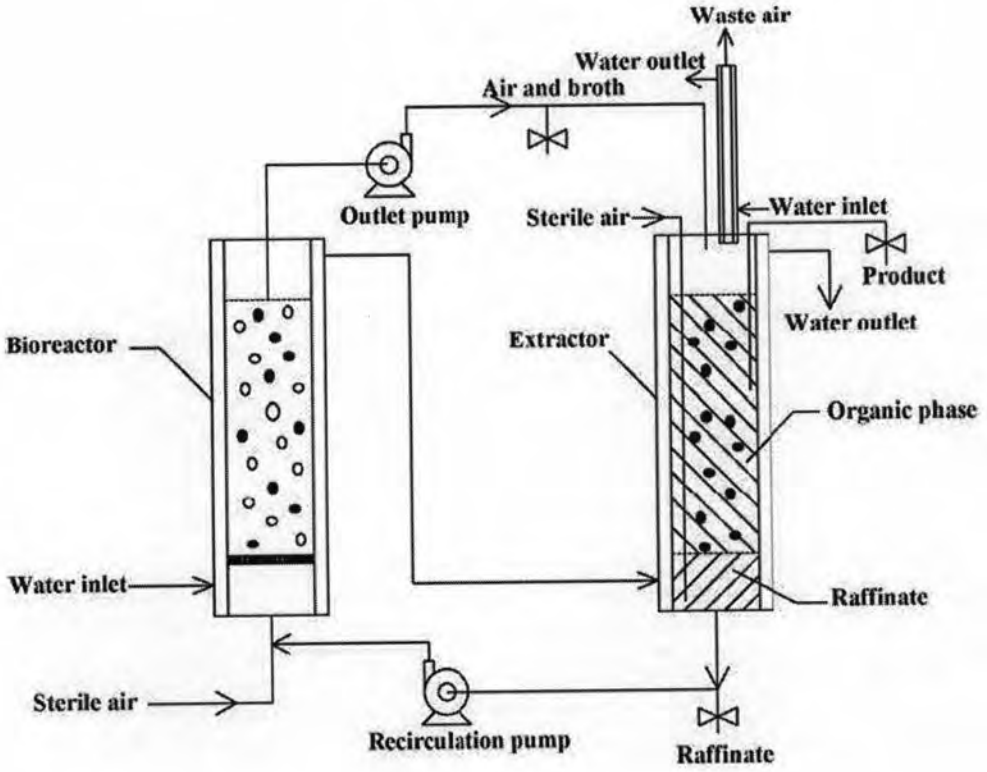
Du และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* ในถังหมักแบบ Bubble column พบว่า ผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตแลกติกเท่ากับ 1.46 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 78 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักนาน 27 ชั่วโมง

2.6 การออกแบบและพัฒนาถังหมัก

หน้าที่สำคัญของถังหมัก ได้แก่ การทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่สามารถควบคุมได้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลิตผลตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องออกแบบถังหมักให้มีความเหมาะสมกับกระบวนการหมักแต่ละชนิด (Liden, 2002)

Lin และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *R. oryzae* ที่ถูกตรึงด้วย Calcium alginate ในถังหมักแบบ Three-phase fluidized bed แสดงดังรูปที่ 2.11

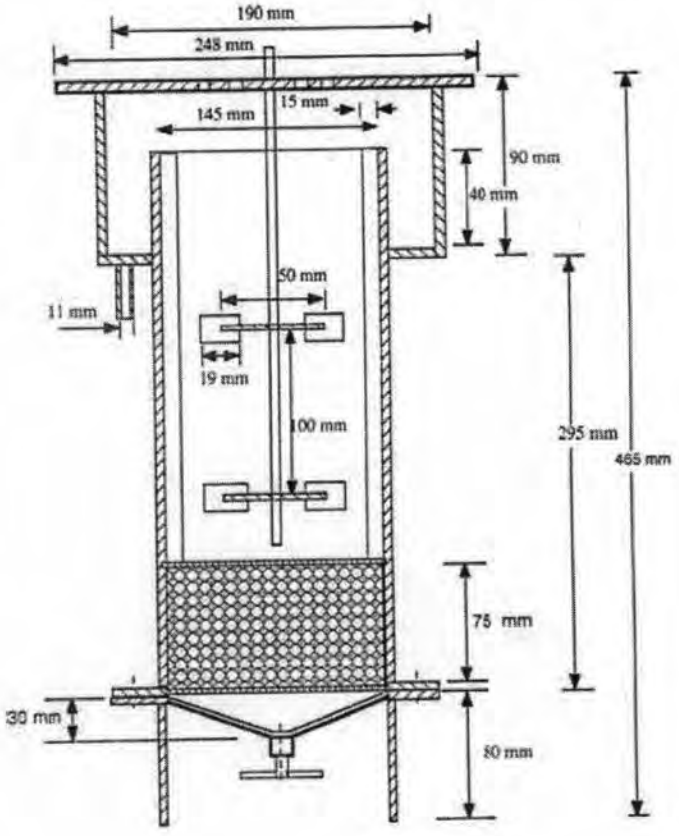
F 44307454



รูปที่ 2.11 ลักษณะของถังหมักแบบ Three-phase fluidized bed

ซึ่งภายในระบบประกอบด้วยคอลัมน์แก้ว 2 แท่ง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 70 มิลลิเมตรและกว้าง 420 มิลลิเมตร ถังหมักจะประกอบด้วย Water jacket เพื่อควบคุมอุณหภูมิ บริเวณด้านล่างของถังจะบรรจุ Glass screen เพื่อรองรับเม็ดบีท โดยเติมหัวเชื้อเริ่มต้นกับเม็ดบีทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 600 มิลลิลิตร อัตราการให้อากาศ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที หลังจากหมัก 12 ชั่วโมง จึงเติมลงไปในคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,200 มิลลิลิตร จึงเริ่มกระบวนการหมัก ที่สภาวะการหมัก 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการไหล 3.0 ลิตรต่อชั่วโมง โดยสามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

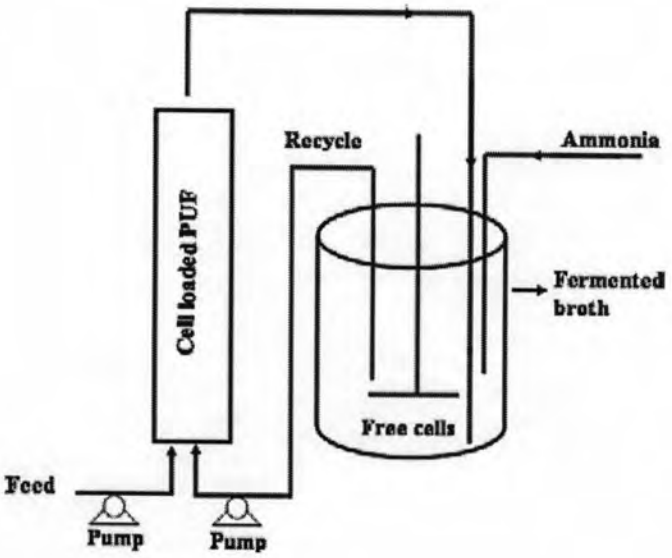
Tango และ Ghaly (2002) โดยได้ออกแบบถังหมักแบบ Packed bed ขึ้นเพื่อใช้ในการตรึง *Lactobaccillus Helveticus* ทำการหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้แลกโตสความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักแบบ Packed bed ถังหมักสูง 465 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของถัง 145 มิลลิเมตร หนา 6 มิลลิเมตร โดยมีพื้นที่ขนาด 75 มิลลิเมตร หรือปริมาตร 1.01 ลิตร เพื่อไว้สำหรับให้เซลล์ยึดเกาะ ภายในมีลักษณะเป็นช่อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร โดยมีทั้งหมด 103 ช่อง แสดงดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ลักษณะของถังหมักแบบ Packed bed ที่ใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย

พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติก คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

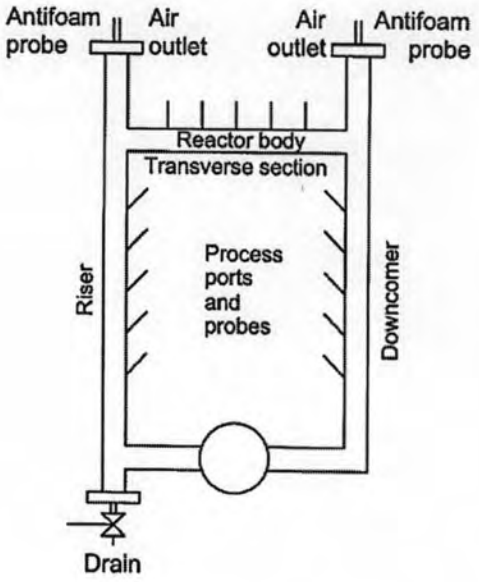
Rangaswamy และ Ramakrishna (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเทคนิคการตรึงเซลล์ *Lactobacillus delbrueckii* บน Poly-urethane foam (PUF) ในถังหมักแบบ Packed bed biofilm reactor (PBBR) ซึ่งลักษณะของถังหมักแบบ PBBR ประกอบด้วย คอลัมน์แจ็คเก็ตแก้ว ขนาด 5.5x4.8x60 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวถังหมักบรรจุด้วย PUF หนัก 16 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ *L. delbrueckii* ที่เจริญในอาหาร MRS ด้วยปั๊มปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เมื่อ 24 ชั่วโมงผ่านไปเซลล์จะไปตรึงใน PUF โดยอุณหภูมิในการหมักคือ 42 องศาเซลเซียส เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการไหลเท่ากับ 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เมื่อได้ถังหมักแบบ biofilm แล้วจะนำมาต่อกับถังกวนเพื่อทำการหมักด้วยถังคู่แบบต่อเนื่อง (Dual reactor system) ดังรูปที่ 2.13 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหารปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการไหลเท่ากับ 250 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่าพีเอชเท่ากับ 6



รูปที่ 2.13 ลักษณะของถังหมักแบบ Packed bed biofilm reactor (PBBR)

พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าอัตราการผลิตรกรดแลกติกเท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

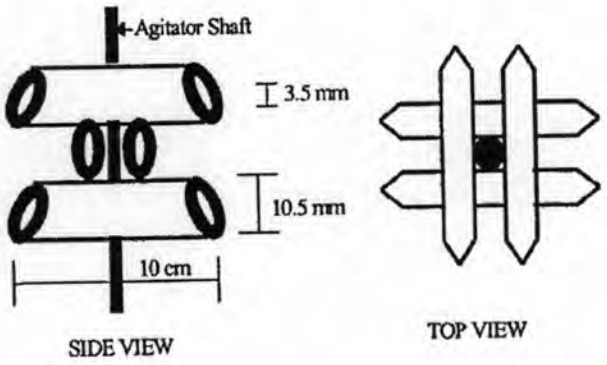
Papagianni และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดซิตริกด้วย *Aspergillus niger* ในถังหมักแบบ Tubular loop bioreactor (TLB) ที่ดัดแปลงจากถังกวน ตัวถังหมักทำมาจาก borosilicate glass หนา 25 มิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 2.14 หมักแบบไหลวน มีมาตรวัดป้องกันฟองที่ด้านบนของถังหมัก



รูปที่ 2.14 ถังหมักแบบ Tubular loop bioreactor (TLB)

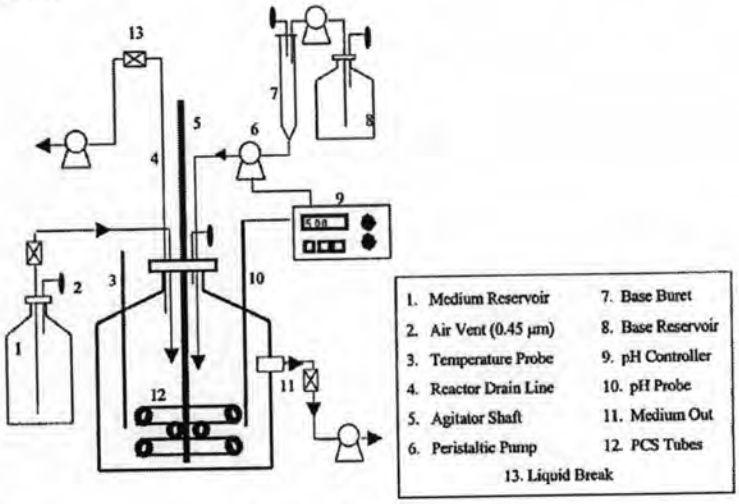
ทำการหมักด้วยปริมาตร 2.5 ลิตร ด้วยการเจริญแบบกลุ่มก้อน ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พีเอชที่ 2.1 พบว่า ถังหมักแบบ Tubular loop bioreactor สามารถผลิตกรดซิตริกได้สูงประมาณ 120 กรัมต่อลิตร

Cottton และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (ATCC 1143) ในถังหมักแบบ Plastic composite support (PCS) ทำการหมักแบบต่อเนื่อง ลักษณะของ PCS เป็น Biofilm หนา 3.5 มิลลิเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.5 มิลลิเมตร ระยะห่างของ PCS เท่ากับ 10 เซนติเมตร ประกอบด้วย PCS จำนวน 6 ตัว วางตามแนวนอนชั้นละ 2 ตัวและมี 3 ชั้นที่ยึดอยู่กับแกนใบพัด แสดงดังรูปที่ 2.15



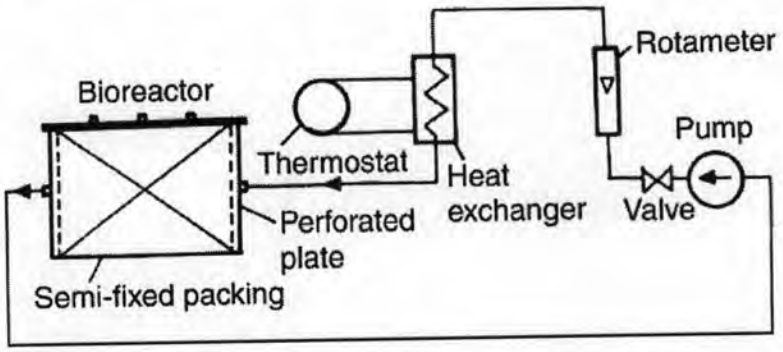
รูปที่ 2.15 ลักษณะของ Plastic composite support (PCS)

โดยได้ออกแบบการทดลองดังรูปที่ 2.16 ถังหมักถูกดัดแปลงจากถังกวน เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์จากการเกษตร 50 เปอร์เซ็นต์ (wt/wt) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 9.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่ออัตราการไหลเท่ากับ 0.4 ลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 2.16 แบบการทดลองในถังหมักแบบ Plastic composite support (PCS)

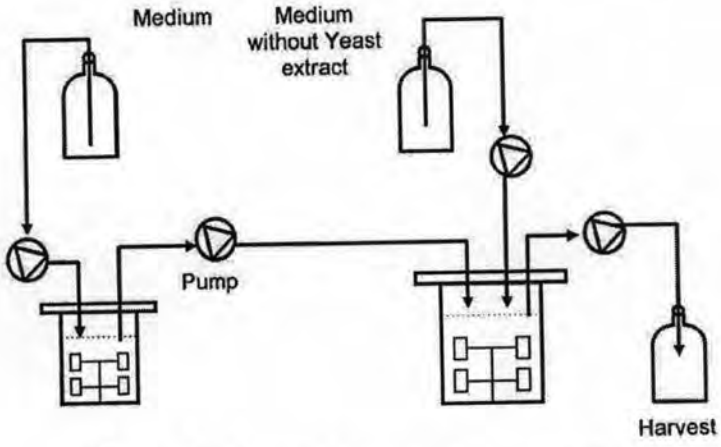
Daraktchiev และคณะ (1997) ได้ออกแบบถังหมักแบบ Semi-fixed packing เพื่อใช้ในการผลิตกรดแลกติก ถังหมักมีขนาด 14 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยโครงร่างที่ขึงอยู่ภายใน (Raschell) เพื่อใช้ในการยึดเกาะของเซลล์ ลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 200x300 ตารางมิลลิเมตร (รูปที่ 2.17) มีปั๊มช่วยเติมอาหาร



รูปที่ 2.17 ถังหมักแบบ Semi-fixed packing

เชื้อที่ใช้คือ *Lactobacillus casei* ทำการหมักแบบไม่ใช้อากาศ ด้วยแลกโตสความเข้มข้น 31 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 36-37 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 6-6.5 พบว่า สามารถตรึงเซลล์แบคทีเรียได้และช่วยเพิ่มน้ำหนักเซลล์

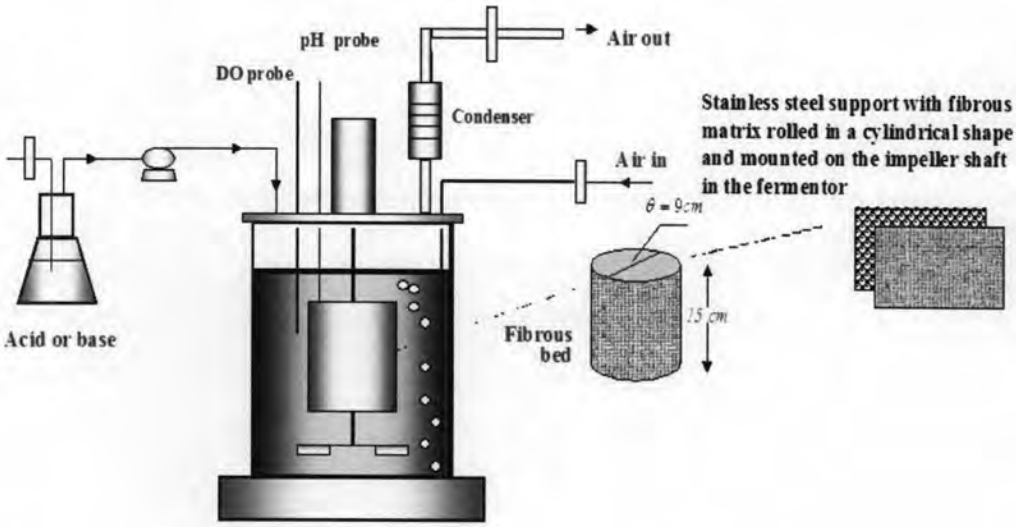
Bruno-Barcena และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus casei* ในถังหมักแบบ Packed-bed 2 ระบบ (Two-stage systems) ทำการหมักแบบต่อเนื่อง โดยลักษณะถังหมักนั้นประกอบด้วย คอลัมน์แจ็คเก็ตแก้วเพื่อควบคุมอุณหภูมิ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตรในถังแรก ถังที่สองมีขนาดของคอลัมน์แจ็คเก็ตแก้วเท่ากับ 3.5 เซนติเมตร สูง 14 เซนติเมตร ภายในบรรจุด้วย Porous foam glass ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร ด้วยอัตราส่วนปริมาตรต่อช่อง 60 เปอร์เซ็นต์ หนา 2 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวคอลัมน์ประกอบด้วย External Loop และมาตรวัดค่าพีเอช (รูปที่ 2.18)



รูปที่ 2.18 ถังหมักแบบ 2 ระบบ (Two-stage systems)

พบว่า การสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 57.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 9.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือกลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิในถังแรกและถังที่สองที่ 42 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.0

Tay และ Yang (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการตรึง *R. oryzae* NRRL 395 โดยได้ออกแบบและพัฒนาถังกวนขึ้นเป็นถังหมักแบบ Rotating fibrous-bed bioreactor (RFB) โดยมีโครงร่างแบบทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร ทำจากสแตนเลสสตีล ซึ่งยึดอยู่กับฝาบนของถังหมักและใช้ตะแกรงสแตนเลสสตีลหุ้มเป็นโครงร่าง RFB จากนั้นจึงหุ้มด้วยเส้นใยผ้าฝ้าย 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.19 ลักษณะของถังหมักแบบ Rotating fibrous-bed bioreactor (RFB)

พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 127 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกเหนือจากกลูโคส เมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติก คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

จากงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการผลิตกรดแลกติกในระดับขวดเขย่าและถังหมัก แสดงให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก เช่นปัจจัยเรื่องการควบคุมสัณฐานของเชื้อรา การรักษาระดับออกซิเจน ชนิดของเชื้อที่ใช้เลี้ยง สภาวะต่างๆที่เหมาะสม ระบบการหมักและชนิดของถังหมัก โดยเป้าหมายหลักคือเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติก