บทที่ 3

ทฤษฎี

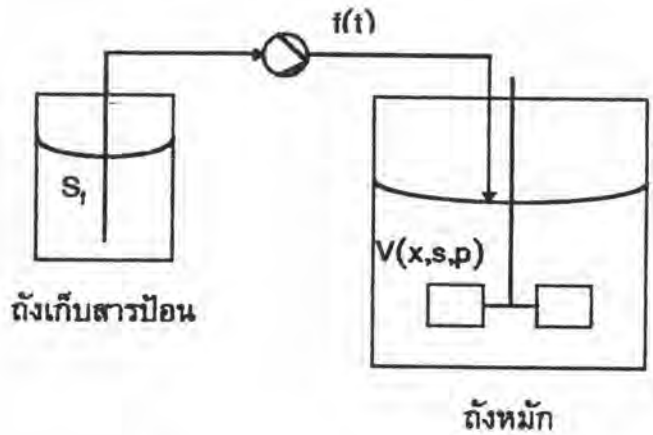
ทฤษฎีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง หรือการหมักแบบไม่ต่อเนื่องชนิดมีการเติมสารป้อน

3.1 ลักษณะโดยทั่วไป

วิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง หรือการหมักแบบไม่ต่อเนื่องชนิดมีการเติมสารป้อน (fed-batch technique) เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารเข้าสู่ถังหมักในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งอาจเป็นการเติมแบบครั้งคราว หรือเติมแบบต่อเนื่องก็ได้ แต่จะไม่มีการดึงเอาของเหลวภายในถังหมักออกจนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันในกรณีที่การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหาร หรือองค์ประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งในถังหมัก มีผลต่อค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร (yield) หรือค่าอัตราผลผลิต (productivity) ได้แก่ กรณีต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ในกรณีที่ความเข้มข้นของสารอาหารมีผลยับยั้งต่อค่าดังกล่าว เช่น กรณีที่ใช้เมธานอล เอธานอล หรือสารประกอบอะโรมาติกเป็นสารตั้งต้น ซึ่งมักจะพบเสมอๆ ว่า เมื่อใช้สารตั้งต้นกลุ่มนี้ในปริมาณความเข้มข้นสูงๆ จะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ช้าลง การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารในกลุ่มนี้จึงจำเป็นจะต้องค่อยๆ ป้อนสารตั้งต้นเข้าสู่ถังหมักอย่างช้าๆ เพื่อป้องกันไม่ให้มีการสะสมเพิ่มความเข้มข้นจนถึงระดับที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้
2. ในกรณีที่ต้องการเซลล์ในปริมาณความเข้มข้นสูงมากๆ จำเป็นต้องใช้สารอาหารที่ความเข้มข้นสูงมากด้วย ซึ่งตามปกติจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์
3. ในกรณีที่เกิดการยับยั้งปฏิกริยาย่อยสลายสารอาหาร (catabolic repression) เนื่องมาจากมีการใช้สารอาหารที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่า ตัวอย่างเช่น มีกลูโคสอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง จะมีผลให้เกิดการหยุดสร้างเอนไซม์หลายอย่างขึ้น
4. ในกรณีที่ต้องการลดความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยงซึ่งเกิดจากผลิตภัณฑ์ อย่างเช่น ในกระบวนการผลิต เด็กซ์แทรน (dextran), พัลลูแลน (pullulan) หรือ แซนแทนกัม (xanthan gum) เป็นต้น

นอกจากนี้การหมักแบบกึ่งต่อเนื่องยังใช้ในกรณีที่ต้องการยืดระยะเวลาการหมักให้ยาวนานขึ้น เช่น การผลิตสารแอนติไบโอติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นในช่วงระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโต ทำให้ระยะเวลาการหมักยาวนาน จนทำให้น้ำภายในถังหมักระเหยหายไปมาก จึงนิยมใช้การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เพื่อเติมน้ำลงไปทดแทนน้ำที่หายไปนั้นด้วย



รูปที่ 3.1 กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

สำหรับในกรณีของการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต นอกจากจะต้องการเซลล์ในปริมาณความเข้มข้นที่สูงมากแล้ว กระบวนการหมักยังแบ่งออกเป็นสองช่วง ซึ่งต้องการอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน และเพื่อให้ได้อัตราผลผลิตที่ดี อาหารเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ยังจะต้องมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันไป จึงเป็นความจำเป็นที่จะต้องใช้กระบวนการหมักในแบบกึ่งต่อเนื่อง

3.2 รูปแบบทางคณิตศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง

กำหนดให้ถังหมักเป็นถังปฏิกริยาแบบมีการผสมกันอย่างสมบูรณ์ การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารเพียงชนิดเดียว โดยสารชนิดอื่นๆ มีในปริมาณที่มากเกินพอ มีการเติมสารอาหารชนิดนี้เข้าสู่ถังหมักโดยเริ่มเติมตั้งแต่เริ่มการเจริญเติบโตในแบบเอ็กโปเนนเชียล และไม่มีการดึงเอาน้ำหมักออกในระหว่างการเพาะเลี้ยง

จากข้อกำหนดดังกล่าวข้างต้น อาศัยการทำสมดุลมวลสารเพื่อสร้างชุดสมการเพื่อแสดงลักษณะทางจลนศาสตร์ของกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในแบบกึ่งต่อเนื่อง ดังนี้

สมดุลมวลสารของปริมาณเซลล์

อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์	=	อัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์จากการเติมสารป้อน	+	อัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์จากการเจริญเติบโต	−	อัตราการลดปริมาณเซลล์จากการไหลออก

$$\frac{d(VX)}{dt} = FX_f + \mu VX - F_{out}X \qquad 3.1$$

เนื่องจากสารป้อนที่ใช้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจึงเติมเข้าสู่ถังหมัก ดังนั้นจึงไม่มีปริมาณเซลล์ใด ๆ อยู่ และในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบกึ่งต่อเนื่องไม่มีการถ่ายของเหลวภายในออก ดังนั้นจึงตัดเทอมแรกและเทอมสุดท้าย ด้านซ้ายมือออกได้ จัดรูปสมการใหม่ได้เป็น

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu VX \qquad 3.2$$

สมดุลมวลสารของปริมาณสารอาหาร

อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหาร = อัตราการเพิ่มปริมาณสารอาหารสารป้อน − อัตราการใช้สารอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ − อัตราการลดปริมาณสารอาหารจากการไหลออก

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_f - \left(\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{d(VX)}{dt} - mVX\right) - F_{out}S \qquad 3.3$$

เนื่องจากในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบกึ่งต่อเนื่องไม่มีการถ่ายของเหลวภายในออก ดังนั้นจึงตัดเทอมแรกและเทอมสุดท้าย ด้านซ้ายมือออกได้ จัดรูปสมการใหม่ได้เป็น

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_f - \left(\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{d(VX)}{dt} - mVX\right) \qquad 3.4$$

โดยที่ μ ในสมการที่ 3.1 ถึง 3.4 คือ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ สำหรับกรณีที่ค่าปริมาตรมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา มีนิยามว่า

$$\mu \equiv \frac{1}{VX} \cdot \frac{d(VX)}{dt} \qquad 3.5$$

โดยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆอย่าง เช่น ปริมาณผลิตภัณฑ์ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่ควบคุมสภาวะต่าง ๆให้คงที่ได้ และ ในงานวิจัยนี้ผลิตภัณฑ์ที่เชื้อจุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้น ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงสามารถกำหนดได้ว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารเพียงอย่างเดียว

$$\mu = g(S) \qquad 3.6$$

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง สามารถแสดงในรูปสมการทางคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

$$\frac{dV}{dt} = F + f_{acid} + f_{base} + f_{antifoam} - f_{vap} \qquad 3.7$$

สมการที่ 3.2 บรรยายการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยที่ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ มีค่าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารอาหารตามสมการที่ 3.6 สมการที่ 3.4 บรรยายการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอาหารภายในถังหมัก พจน์แรกทางด้านขวามือแสดงปริมาณสารอาหารที่เข้าสู่ถังหมัก พจน์ที่สองแสดงค่าอัตราการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ พจน์สุดท้ายแสดงค่าอัตราการใช้สารอาหารเพื่อการดำรงชีพของเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับกรณีการเพาะเลี้ยงด้วยสารอาหารที่สามารถระเหยได้โดยง่าย และเป็นการเพาะเลี้ยงแบบมีการให้อากาศ จะต้องคำนึงถึงอัตราการสูญเสียสารอาหารเนื่องจากการระเหยด้วย สมการที่ 3.7 แสดงอัตราการเพิ่มปริมาตรการเพาะเลี้ยงว่าขึ้นอยู่กับค่าทางขวามือ ซึ่งได้แก่ ค่าอัตราการเติมสารอาหาร ค่าอัตราการเติมกรดและเบส เพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่าง ค่าอัตราการเติมสารต่อต้านการเกิดฟอง และค่าอัตราการระเหยของน้ำหมัก ซึ่งโดยปกติค่าอัตราการระเหยอาจจะไม่คำนึงถึงก็ได้ ถ้าหากเป็นการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศ สำหรับกรณีที่มีการเติมอากาศหากเป็นการหมักในระยะเวลาสั้น ๆ อาจไม่คำนึงถึงก็ได้โดยถือว่ามีค่าน้อยมาก

กำหนดให้ค่าอัตราการเติมกรดและเบส เพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่าง ค่าอัตราการเติมสารต่อต้านการเกิดฟอง และค่าอัตราการระเหยของน้ำหมักมีค่าน้อยมาก เมื่อเทียบกับค่าอัตราการเติมสารอาหาร จะได้สมการที่ 3.7 ใหม่ดังนี้

$$\frac{dV}{dt} = F \qquad 3.8$$

แทนค่าจากสมการที่ 3.8 ลงในสมการที่ 3.2 จะได้ว่า

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - \frac{F}{V}) \cdot X \qquad 3.9$$

และแทนค่าจากสมการที่ 3.8 ลงในสมการที่ 3.4 จะได้ว่า

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (S_f - S) - \left(\frac{\mu}{Y_{x/s}} + m\right) \cdot X \qquad 3.10$$

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเพาะเลี้ยง จำเป็นต้องทราบแบบจำลองการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ หรือความสัมพันธ์ของค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารอาหาร หรือสมการที่ 3.6

หลังจากที่ทราบความสัมพันธ์ของของค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของสารอาหาร หรือสมการที่ 3.6 แทนค่าลงในสมการที่ 3.9 จากนั้นแทนค่าอัตราการเติมสารป้อนตามเวลาเข้าไป อินทิเกรทสมการที่ 3.8 ถึง 3.10 ก็จะได้ค่าแสดงปริมาณเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ ค่าความเข้มข้นสารอาหาร และค่าปริมาตรที่เวลาต่างๆ ได้

3.3 วิธีการควบคุมการเติมสารป้อนของกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch technique)

กระบวนการการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch technique) จัดแบ่งออกเป็นได้สองกลุ่มใหญ่ๆ จำแนกตามวิธีการควบคุมการเติมสารป้อน (Yamane, 1984) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

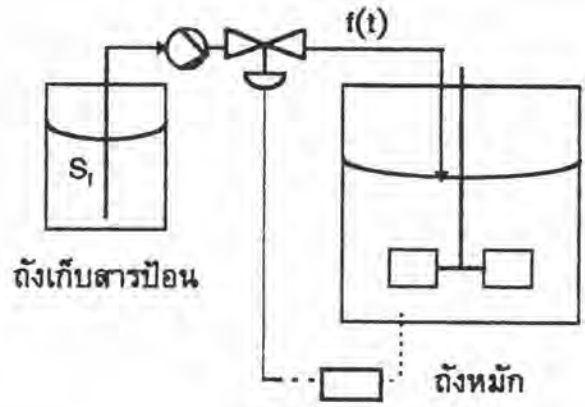
วิธีการควบคุมการเติมสารป้อนในกลุ่มแรก มีลักษณะเติมสารป้อนตามแบบที่ได้กำหนดไว้ก่อน โดยยึดหลักว่า หากเชื้อที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ (inoculum) และภาวะเริ่มต้นการหมักเป็นแบบเดียวกันกับที่ได้ทดลองไว้ก่อน หรือได้ทำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ไว้ก่อน ผลที่ได้ย่อมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งตามปกติแล้วเป็นการยากที่จะคำนึงถึงการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักได้หมดสิ้น ทำให้ผลที่ได้จากการหมักมักไม่เป็นไปตามที่ได้ออกแบบไว้ โดยทั่วๆ ไปวิธีการเติมสารป้อนในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 3 วิธีคือ 1) เติมสารป้อนเข้าในอัตราที่คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก 2) เติมสารป้อนโดยเพิ่มอัตราการเติมในแบบเอ็กโปเนนเชียล 3) เติมสารป้อนเข้าตามวิธีการที่ได้วางแผนไว้ก่อนว่าจะดีที่สุด

ตารางที่ 3.1 กระบวนการการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch technique) ประเภทต่างๆ จำแนกตามวิธีการควบคุมการเติมสารป้อน (Yamane, 1984)

1. Without feedback control
1.1 Intermittent addition
1.2 Constant rate
1.3 Exponentially increased rate
1.4 Optimized
1.5 Others
2. With feedback control
2.1 Indirect feedback control
2.2 Direct feedback control
2.3 Constant value control
2.4 Optimal control

วิธีการควบคุมการเติมสารป้อนในกลุ่มที่สอง หรือควบคุมการเติมสารป้อนโดยอาศัยข้อมูลจากการเพาะเลี้ยงเป็นข้อมูลย้อนกลับ เป็นการควบคุมที่ให้ผลที่ค่อนข้างแน่นอนกว่า เนื่องจากมีการคำนึงถึงภาวะต่างๆ ที่เกิดขึ้นจริงตลอดเวลา วิธีการในกลุ่มนี้จัดแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ ใช้ข้อมูลที่ได้จากการวัดโดยตรงมาทำการควบคุม เช่น วัดค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยตรง แล้วนำไปปรับเปลี่ยนอัตราการเติมกลูโคสเป็นต้น และอีกกลุ่มคือ นำข้อมูลที่ได้

ของสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



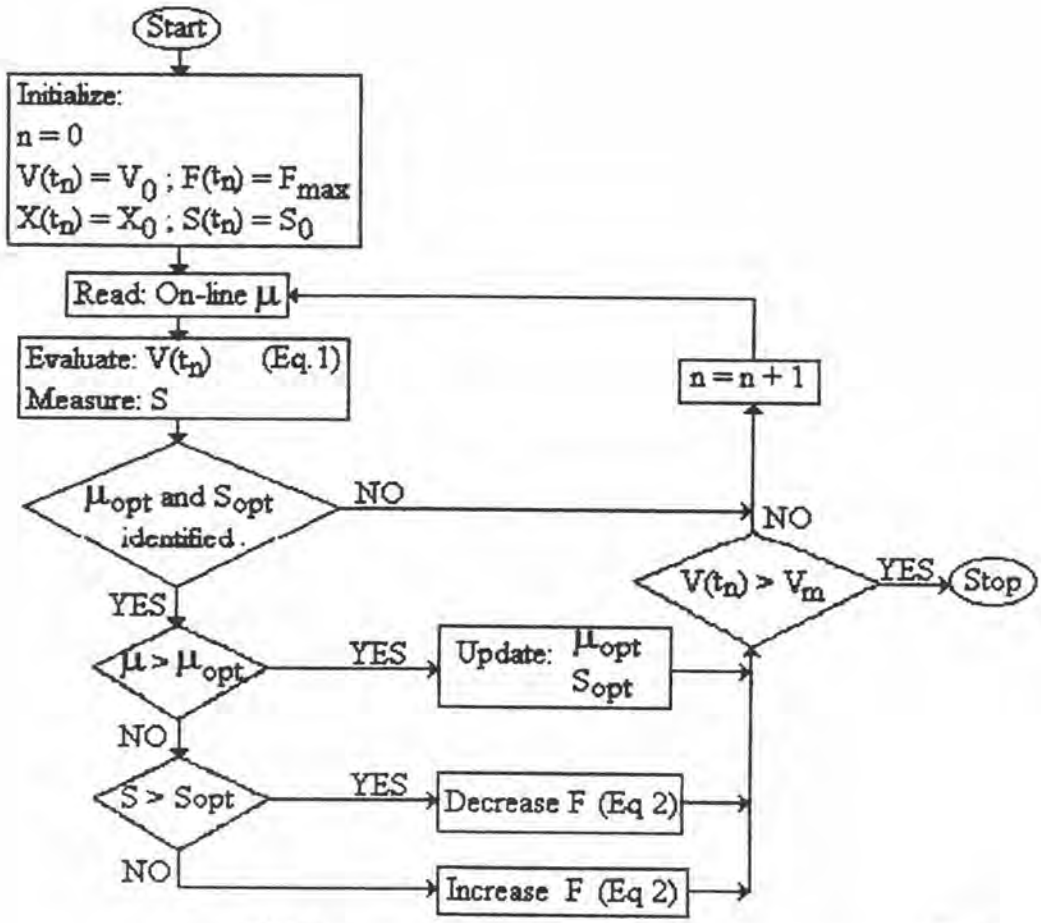
รูปที่ 3.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง
โดยมีการป้อนข้อมูลย้อนกลับ

จากการวัดมาคำนวณหาค่าอื่นๆ ตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้สร้างไว้ จากนั้นจึงนำค่าที่ได้จากการคำนวณไปทำการควบคุมการเติมสารป้อน ข้อมูลที่มักใช้ตรวจวัดติดตาม ได้แก่ ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง (D.O.), ค่าความเป็นกรดด่าง (pH), ค่าอัตราการหายใจ (Respiratory quotient, RQ), ค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์, ความดันย่อยของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ออกจากถังหมัก (P_{co2}), ค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

3.4 การควบคุมการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด

วิธีนี้เป็นการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารที่มีการใช้ค่าอัตราการเจริญเติบโตของจุลชีพเป็นข้อมูลย้อนกลับ เพื่อทำการควบคุมอัตราการป้อนสารอาหารให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตลอดเวลาตามวิธีการของ Agrawal และคณะ (Agrawal P., 1989) มีรายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3.3 มีการตรวจวัดติดตามค่าอัตราการเจริญเติบโตในแบบออนไลน์ จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เปรียบเทียบค่ากับค่าสูงสุดที่ได้เก็บค่าไว้ จากนั้นปรับเปลี่ยนอัตราการป้อนสารอาหาร เพื่อปรับความเข้มข้นของสารอาหารในถังหมัก เพื่อให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตลอดเวลา

การควบคุมกระบวนการหมักที่ใช้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อจุลินทรีย์เป็นข้อมูลย้อนกลับเพื่อควบคุมอัตราการเติมสารอาหารนี้ หากประยุกต์ใช้ในการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตควรจะลดเวลาที่ต้องใช้ในช่วงเจริญเติบโตลงได้



รูปที่ 3.3 แสดงแผนภูมิสายงานการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารที่มีการใช้ค่าอัตราการเจริญเติบโตของจุลชีพเป็นข้อมูลย้อนกลับ เพื่อควบคุมให้ได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตลอดเวลา ของ Agrawal และคณะ (Agrawal, 1989)