บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ในราวศตวรรษที่ 19 Pasteur อธิบายกระบวนการหมักน้ำตาลให้เป็นอัลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เกิดจากการหมักกับเชื้อจุลินทรีย์ คือ เซลล์ยีสต์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (anaerobic process) ดังสมการ เมื่อไม่มีจุลินทรีย์ดังกล่าวกระบวนการหมักก็ไม่เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่า กระบวนการหมักที่แท้จริงนั้นเป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาของเซลที่มีชีวิต

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$$

กลูโคส เอธิลอัลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

ต่อมา Buchers เป็นผู้สกัดสารออกจากเซลของยีสต์ และพบว่าสารที่สกัดได้นี้สามารถที่จะทำให้เกิดการแปรเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นอัลกอฮอล์ เช่นเดียวกับกระบวนการหมักที่ใช้ยีสต์มีชีวิต แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่า สารที่สกัดจากเซลยีสต์คือ เอนไซม์นั่นเอง เอนไซม์ มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางเคมีของเซลที่มีชีวิต ดังนั้นปฏิกิริยาของเอนไซม์เหล่านี้ จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาเรื่องกระบวนการหมัก เพราะสารที่เกิดขึ้นระหว่างขบวนการเมตาบอลิซึม (intermediate products) หรือสารสิ้นสุดท้าย (end products) ที่เกิดจากกระบวนการของจุลินทรีย์จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ผสมที่ผลิตขึ้น

Oviedo (1520) รายงานว่า ชาวพื้นเมืองแถบอินดีสต์รู้จักทำไวน์จากผลสับปะรด แต่เนื่องจากในน้ำสับปะรดมีปริมาณ ester อยู่มากจึงใช้ทำไวน์ไม่ดีนัก ต้องเติมน้ำตาลลงไปมากพอที่จะทำให้อัตราส่วนของ ester ลดต่ำลง

2.1 เอธิลอัลกอฮอล์

เอธิลอัลกอฮอล์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย ตัวอย่างเช่น ใช้เป็นตัวทำละลาย ,ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับขบวนการทางเคมี, ใช้ฆ่าเชื้อโรค , ใช้เป็นเชื้อเพลิง , ใช้เป็นเครื่องดื่ม (เอธิลอัลกอฮอล์) และอื่นๆ

กรรมวิธีการผลิตอัลกอฮอล์ ไม่ยุ่งยากและใช้เวลาสั้น ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำ ราคาอัลกอฮอล์จึงไม่สูงนัก เฉพาะในช่วงสงครามเท่านั้นที่มีราคาสูง ด้วยเหตุนี้การผลิตอัลกอฮอล์จากการหมักผลไม้จึงไม่คุ้มทุน ยกเว้น แต่ถ้าอัลกอฮอล์จากผลไม้จะมีสิ่งเจือปนที่ให้กลิ่นรสที่มีความนิยมเท่านั้น จึงได้ราคาดี เช่น Scotch whisky ราคาสูงที่รู้จักกันดี มีกลิ่นน้ำมันบางอย่างปนอยู่ในอัลกอฮอล์ที่ทำจากข้าวสาลี-บาร์เลย์ อย่างไรก็ตามอัลกอฮอล์ที่ได้จากน้ำผลไม้ พวกสับปะรดมี ester อยู่มากจนเอาไปทำน้ำส้มสายชูที่ดีที่สุดได้ มีนักวิจัยหลายท่านคิดที่จะทำไวน์หรือเบียร์จากน้ำสับปะรดค้นมาบ้างแล้ว ยีสต์ที่ใช้ คือ *Saccharomyces cerevisiae* มักใช้พวก bottom yeast เพราะยีสต์พวกนี้จะอยู่ข้างล่าง และจะหมักกับน้ำตาลอยู่ข้างล่าง ส่วนอัลกอฮอล์ที่ได้จะลอยขึ้นข้างบน ในการทดลองจึงไม่ต้องคอยกวนน้ำหมักให้ผสมกันดี ถ้าใช้ top yeast ต้องคอยกวนให้ยีสต์กับน้ำตาลผสมกัน จึงจะเกิดการหมักตามที่ต้องการ ปัจจุบันการผลิตไวน์สับปะรดยังอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ ส่วนในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตไวน์ส่วนใหญ่จะใช้วัตถุดิบจากองุ่น อัตราการผลิตไวน์ในปีหนึ่งๆประมาณ 335 ล้านเฮกโตลิตร แหล่งผลิตจากประเทศในยุโรปมีถึง 80 % ประเทศอเมริกาเหนือและใต้ผลิตได้ 14 % จากแอฟริกา 4 % และอีก 1 % จากประเทศแถบเอเชีย (ประดิษฐ์, 2529)

งานวิจัยนี้เครื่องที่ใช้เป็น เครื่องหมักแบบคอลัมน์ หรืออีกชื่อหนึ่งว่า เครื่องหมักแบบหอสูง ซึ่งวิวัฒนาการมาจากท่อปฏิกิริยาโดย Lefrancois (1955) เป็นคนแรกที่ออกแบบปรับปรุงให้ดีขึ้น ที่เรียกว่า เครื่องหมักแบบแอร์ลิฟท์ ต่อมาปรับปรุงเป็นเครื่องหมักแบบแอร์ลิฟท์ใหม่ (อำนวย,2521) โดยปรับปรุงให้น้ำหมักไหลเวียนผ่านท่อน้อนย้อนกลับและอัตราส่วนการไหลเวียนของน้ำหมักเป็นสัดส่วนโดยตรงกับอัตราการให้อากาศ ซึ่งจะช่วยให้การผสมผสานของน้ำหมักภายในคอลัมน์ดีขึ้น เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนลงสู่น้ำหมักได้มากขึ้น และยังช่วยถ่ายเทความร้อนที่เกิดขึ้นจากการหมักอีกด้วย

ต่อมา นิคม(2523) ได้ปรับปรุงหัวกระจายอากาศของเครื่องหมักแบบคอลัมน์โดยเลือกหัวกระจายแบบตะแกรง ขนาด 40 ช่องต่อนิ้ว(วิชาพงษ์, 2535) ทำการปรับปรุงระบบกำจัดฟองโดยไม่ต้องใช้สารกำจัดฟอง และทดลองใช้คอลัมน์ผลิตเอธานอลจากน้ำสับปะรดแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองเบื้องต้นในขวดเขย่า น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 14 – 20 องศาบริกซ์

เป็นสารอาหาร และใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต , แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0.05 w/v และแมกนีเซียมซัลเฟต ร้อยละ 0.01 w/v เป็นอาหารเสริม ให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า อัตราการถ่ายเทน้ำหมักที่ดีที่สุด คือ ร้อยละ 25 โดยปริมาตรทุก 3 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ปริมาณเอธานอลร้อยละ 8 โดยปริมาตร แล้วเริ่มถ่ายเทน้ำหมักครั้งแรกชั่วโมงที่ 13

จากนั้น ศจี (2528) ทำการศึกษาการหมักน้ำเสียปะรดแบบต่อเนื่องโดยใช้คอลัมน์ และใช้สภาวะหมักจาก (วิชาพงษ์, 2525) แบ่งคอลัมน์หมักออกเป็น 2 ส่วนคือ คอลัมน์ที่มี การให้อากาศ 1 คอลัมน์ ต่ออนุกรมกับคอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ 8 คอลัมน์ พบว่า การให้อากาศ 0.5 vvm เป็นเวลา 4 ชั่วโมงต่อมาลดเหลือ 0.04 - 0.06 vvm ตลอดการทดลอง อัตราการเจือจาง 0.0210 ชั่วโมง$^{-1}$ เริ่มถ่ายเทน้ำหมักหมักเมื่อได้ เอธานอลร้อยละ 9 โดยปริมาตร เมื่อหมักได้ 21 ชั่วโมง ซึ่งจะให้เริ่มถ่ายเทเอธานอล ร้อยละ 10 โดยปริมาตรที่คอลัมน์ 5

ต่อมา คนอง (2532) ศึกษาผลของตัวแปรบางตัวที่มีต่อการผลิตเอธานอลจาก วัสดุการเกษตรโดยเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดต่อเนื่องสภาวะที่ใช้หมักได้จาก (ศจี, 2528) ทำการกลับทิศทางการไหลของน้ำหมักให้ไหลเข้าตอนล่างของคอลัมน์ไม่ให้อากาศ พบว่า ที่สภาวะสมดุล จะให้อัตราการเจือจางเหมาะสมสูงถึง 0.0230 ชั่วโมง$^{-1}$ และผลของ การนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ในกระบวนการหมัก โดยเลือกวิธีดึงน้ำหมักบางส่วนจากตอนล่าง ของคอลัมน์สุดท้ายกลับมาใช้ในคอลัมน์ที่มีการให้อากาศตลอดการทดลอง ที่สภาวะสมดุล อัตรา ส่วนการป้อนย้อนกลับ 0.3250 และอัตราการเจือจางเหมาะสม 0.3000 ชั่วโมง$^{-1}$ จะให้ ผลผลิตเอธานอลสูงสุด เมื่อเทียบกับอัตราส่วนการป้อนย้อนกลับอื่น ที่ปริมาณเอธานอล ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอธิลอัลกอฮอล์

การคัดเลือกชนิดวัตถุดิบ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตมีความสำคัญอย่างมาก ในอุตสาหกรรมหมักต่างๆ โดยต้องทำการศึกษาทดลองอย่างละเอียดเพื่อหาสัดส่วนของสารอาหารต่างๆที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่นำมาใช้ นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึง ราคา และปริมาณที่มีระหว่างปี ตลอดจนความยากง่ายในการควบคุมมาตรฐานของสูตรอาหาร ให้มีสัดส่วนขององค์ประกอบต่าง ๆ อย่างสมดุลตามต้องการ

โดยทั่วไปนิยมใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกหาได้ง่าย และมีปริมาณเพียงพอตลอดทั้งปี ฉะนั้นอุตสาหกรรมการหมักจึงอาจใช้วัตถุดิบชนิดหลายชนิด เพื่อใช้ทดแทนบางส่วน หรือทั้งหมด เช่น การใช้กากน้ำตาลจากอ้อยแทนกากน้ำตาลจากหัวบีท หรือการใช้เดกซ์ตรินแทนกลูโคส เป็นต้น ปกติแล้ววัตถุดิบส่วนใหญ่ได้มาจากผลิตผลและผลพลอยได้ทางการเกษตร เช่น ข้าว มันฝรั่ง มันสำปะหลัง ข้าวโพด และผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น กากน้ำตาล (molasses) , หางน้ำนม (whey waste) , หรือน้ำแช่ข้าวโพด (cornsteep liquor) เป็นต้น ในที่นี้จะกล่าวถึงวัตถุดิบบางชนิดที่นิยมใช้ คือ

2.2.1 มันสำปะหลัง (cassava)

ประเทศไทยผลิตมันสำปะหลังในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก ทำให้มีราคาถูกสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในรูปแป้งในการผลิตแอลกอฮอล์ ส่วนประกอบต่าง ๆในหัวมันสดมีดังนี้(Tressler และ Joslyn ,1971)

- ความชื้น ประมาณ 57 - 76 % โดยน้ำหนัก
- แป้ง ประมาณ 19.61 - 40.39 % โดยน้ำหนัก
- น้ำตาลรีดิวซ์ 0.71 - 3.93 % โดยน้ำหนัก

แต่ในการผลิตอัลกอฮอล์จากมันสำปะหลังมีขั้นตอนยุ่งยาก และสิ้นเปลืองเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กากน้ำตาล เช่น ต้องมีการย่อยแป้งในมันสำปะหลังให้กลายเป็นน้ำตาลเสียก่อน โดยใช้เอนไซม์ α-amylase ดังนั้นจึงต้องมีสารใช้จ่ายเกี่ยวกับสารเคมีและเอนไซม์นี้ อีกทั้งต้องเติมเกลือแร่และวิตามินลงไปเพื่อช่วยในการเจริญของยีสต์เป็นปริมาณมาก เพราะมันสำปะหลังขาดธาตุอาหารเสริมที่สำคัญหลายอย่างและใช้เวลาหมักนานถึง72 ชั่วโมง จึงจะได้เอธานอล(anhydrous) ประมาณ 4.67 กิโลกรัม/ลิตร และค่าใช้จ่ายในการผลิตประมาณ 12.39 บาท/ลิตร (Poonsook และ Ampon, 2530)

จึงทำให้การผลิตอัลกอฮอล์จากมันสำปะหลังยังไม่เป็นที่แพร่หลาย แต่ถ้ามีการปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีขั้นตอนน้อยลง ซึ่งจะทำให้ค่าใช้จ่ายลดลงและเวลาในการหมักให้สั้นกว่านี้ ก็จะทำให้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตอัลกอฮอล์ในอนาคตได้

2.2.2 กากน้ำตาล (molasses)

กากน้ำตาลที่ได้จากโรงงานน้ำตาลจัดเป็นวัตถุดิบสำคัญอีกที่สุดในอุตสาหกรรมการผลิตอัลกอฮอล์ เพราะราคาถูก หาได้ง่าย และมีปริมาณมาก ถึงแม้ในกากน้ำตาลจะมีสิ่งเจือปนสูง รวมทั้งมีสารหลายชนิดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมทั้งยีสต์ ส่วนประกอบของกากน้ำตาลขึ้นกับวัตถุดิบที่ใช้ผลิตน้ำตาล เช่น กากน้ำตาลที่ได้จากการทำน้ำตาลทรายจากอ้อย มีส่วนประกอบเป็นน้ำตาลประมาณ ร้อยละ 52 (ซูโครส ร้อยละ 30 และน้ำตาลอินเวิร์ทร้อยละ 22) , เถ้า ร้อยละ 9.8 ,สารอินทรีย์อื่น ร้อยละ 19.16 และน้ำ ร้อยละ 16.0 ส่วนกากน้ำตาลที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำตาลจากหัวบีท มีส่วนประกอบเป็นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 48.5 , น้ำตาลอินเวิร์ทร้อยละ 1.0, แรมฟิโนสร้อยละ 1.0 , เถ้าร้อยละ 10.8 , สารอินทรีย์อื่น ๆ ร้อยละ 20.7 และน้ำ ร้อยละ 18.0 แต่มีไบโอตินในปริมาณต่ำกว่ากากน้ำตาลจากอ้อยหลายเท่า นอกจากนี้ ส่วนประกอบของกากน้ำตาลยังขึ้นอยู่กับ ฤดูกาลที่ผลิต แหล่งผลิต กรรมวิธีการผลิต และสภาวะการเก็บรักษา สิ่งเจือปนต่างๆในกากน้ำตาลนี้เองที่ทำให้เกิดสภาวะไม่เหมาะต่อการหมัก เป็นเหตุให้อัตราการหมักต่ำมาก เช่น การหมักอัลกอฮอล์ของโรงงานสุราทั่วไปใช้เวลาหมักถึง 50 ชั่วโมง กล่าวได้ว่า ประสิทธิภาพการหมักต่ำ จึงทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการผลิตมาก (Rosario,1983)

2.2.3 เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสจะเป็นวัตถุดิบที่สำคัญชนิดหนึ่งในอนาคตซึ่งเหมาะสมจะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ รวมทั้งการหมักด้วย เพราะมีจำนวนมาก ราคาถูก และหาได้ง่าย แต่ค่าใช้จ่ายในการผลิตยังสูงอยู่มาก ซึ่งในปัจจุบันการนำสารพวกเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักกับเชื้อจุลินทรีย์ยังเป็นงานในระดับห้องปฏิบัติการและระดับขยายส่วน เพราะก่อนที่จะนำพวกเซลลูโลสมาใช้หมัก ต้องมีการไฮโดรไลซีสด้วยกรดหรือใช้เอนไซม์ย่อย จนเป็น D-xylose แล้วค่อยนำมาหมักกับเชื้อจุลินทรีย์ คือ พวก D-xylose bacteria (เช่น *Aeromonas hydrophila* , *Bacillus macerans* เป็นต้น) ,

พวก mold (เช่น *Fusarium* , *Mucor* , *Rhizopus*) และยีสต์พวก *Saccharomyces cerevisiae* , *Schizosaccharomyces pombe* เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้อัลกอฮอล์เข้มข้น 6.3% โดยน้ำหนัก (Chiang , Hsiao, Ueng, Chen and Tsao, 1981) และการหมักสาร D-xylose ด้วยยีสต์ให้อัตราการหมักสูง , ระบบทนต่อเอธานอลได้ดี ผลผลิตสูง ขณะที่ใช้แบคทีเรียผลิตเอธานอล จะได้ผลพลอยได้ที่ไม่ต้องการระหว่างการหมักด้วย เช่น พวกกรดแลคติค ,กรดอะซิติก เป็นต้น

2.2.4 น้ำสับปะรด (pineapple juice)

น้ำสับปะรดเป็นวัตถุดิบการเกษตรที่สำคัญที่สามารถนำมาผลิตอัลกอฮอล์ ซึ่งในขณะนี้เป็นงานวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการและระดับขยายส่วน น้ำสับปะรดได้มาจากน้ำล้างสับปะรด สับปะรดที่ไม่ได้ขนาด แกน และชิ้นส่วนต่างๆซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการจากโรงงานสับปะรดกระป๋อง จึงทำให้มีราคาต่ำและมีจำนวนมาก ในประเทศไทยมีการปลูกสับปะรดกันมากและได้ผลผลิตสูงจึงมีปริมาณสูงตลอดทั้งปี โรงงานอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องในประเทศไทยมากกว่า 13 โรง ซึ่งทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นจำนวนมาก องค์ประกอบของน้ำสับปะรดจะแตกต่างกันไป ขึ้นกับ พื้นที่ในการเพาะปลูกและสภาพดินฟ้าอากาศ องค์ประกอบหลักของน้ำสับปะรดมี น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2.3 , น้ำตาลฟรุคโตสร้อยละ 1.4 และน้ำตาลซูโครสร้อยละ 8.0 นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ อีก เช่น ไทอามีน , ไรโบฟลาวิน , วิตะมินบี 6 ,โปตัสเซียม และมีค่าความเป็นกรด - ด่าง ช่วง 3.3 - 3.7 ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2 จะเห็นว่า ในน้ำสับปะรดมีสารอาหารอยู่มากพอต่อการเจริญเติบโตและการหมักของเซลยีสต์ และต้องการสารอาหารเสริมในรูปของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ แมกนีเซียมเสริมอีกเพียงเล็กน้อย งานวิจัยการผลิตเอธานอลจากน้ำสับปะรดได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ที่ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาฯ โดยได้เริ่มทำการทดลองผลิตอัลกอฮอล์จากน้ำสับปะรดที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อจะได้อัลกอฮอล์ประมาณ 11 % โดยปริมาตร โดยใช้เวลาการหมักสั้นเพียง 22 ชั่วโมง (นิคม , 2523) งานวิจัยต่อมาเป็นการหมักน้ำสับปะรดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยยีสต์ *Saccharomyces ellipsoideus* แบบไม่ต่อเนื่อง ได้อัลกอฮอล์ประมาณ 9 % โดยปริมาตร ใช้เวลาการหมักทั้งสิ้น 24 ชั่วโมง (ศรี , 2528) และได้มีการศึกษา

วิจัยผลของตัวแปรที่มีต่อการผลิต เอธานอลจากข้าสัยประดด้วย เครื่องหมักแบบคอสัมน์ต่อ เนื่อง ซึ่งพบว่า ระบบหมักที่ศึกษานี้สามารถผลิตอัลกอฮอล์ 11 % โดยปริมาตร (คนอง ,2532)

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำสับปะรดแช่แข็ง(Tressler และ Joslyn,1971) และสับปะรดปนในเมืองไทย (กรมส่งเสริมการเกษตร,2513) โดยเฉลี่ย (คิดเป็นร้อยละ)

ส่วนประกอบ (ร้อยละ)	น้ำสับปะรดแช่แข็ง	สับปะรดปน
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	13.8	
ปริมาณเถ้า	0.35	
	0.03	0.03
โปรตีน	0.41	0.4
ปริมาณเสี้ยน	0.11	0.5
คาร์โบไฮเดรต(ทั้งหมด)	13.0	14.0
พลังงาน (แคลลอรี่ ต่อ 100 กรัม)	49.0	54.0

ตาราง 2.4 สารอนินทรีย์ที่สำคัญในจุลินทรีย์ 3 ชนิด (Aiba , 1968)

ธาตุ	แบคทีเรีย (กรัมต่อ100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	รา (กรัมต่อ100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	ยีสต์ (กรัมต่อ100 กรัม น้ำหนักแห้ง)
ฟอสฟอรัส	2.0-3.0	0.4-4.5	0.8-2.6
ซัลเฟอร์	0.2-1.0	0.1-0.5	0.01-0.24
โปตัสเซียม	1.0-4.5	0.2-2.5	1.0-4.0
แมกนีเซียม	0.1-0.5	0.1-0.3	0.1-0.5
โซเดียม	0.5-1.0	0.02-0.5	0.01-0.1
แคลเซียม	0.01-1.1	0.0-1.4	0.1-0.3
เหล็ก	0.02-0.2	0.1-0.2	0.01-0.5
ทองแดง	0.01-0.02		0.002-0.01
แมงกานีส	0.001-0.01		0.0005-0.007
โมลิบดีนัม			0.0001-0.0002

2.3 จุลินทรีย์ที่สำคัญในกระบวนการหมัก

ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตอัลกอฮอล์ จุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุด คือยีสต์ ซึ่งเป็นพวกราแท้ (true fungi) ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในชั้นแอสโคไมซีติส (Class Ascomycetes) ไม่มีคลอโรฟิลล์ มีนิวเคลียส เคลื่อนไหวไม่ได้ รูปร่างกลมรี หรือรูปไข่ มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย คือ กว้างประมาณ 1 - 5 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 5 - 30 ไมโครเมตร ตารางที่ 2.3 และ 2.4 แสดงองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ประเภทอื่นๆ

ซึ่งในเซลล์ยีสต์มีส่วนประกอบดังนี้

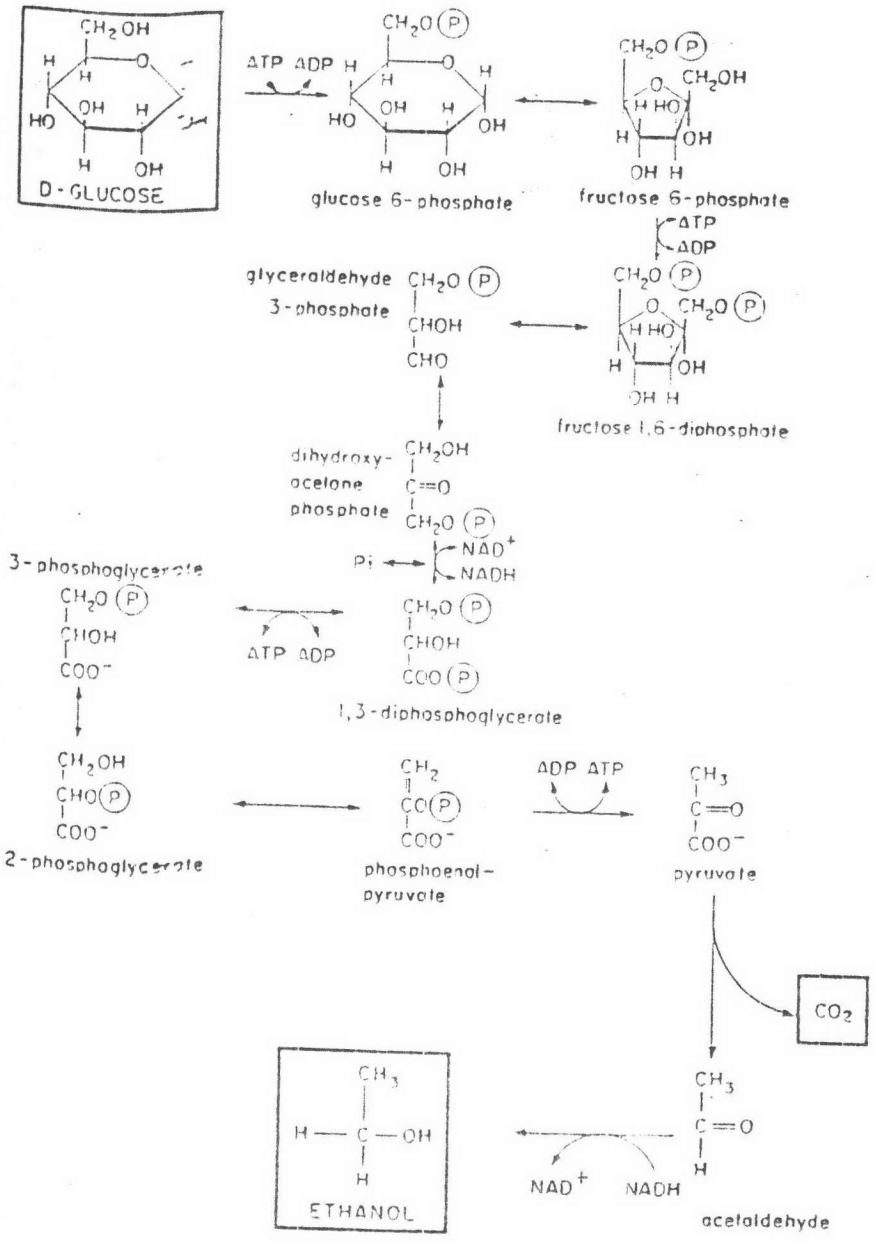
- ความชื้นร้อยละ 68 - 83
- คาร์โบไฮเดรตอยู่ในกลูแคนและแมนแนน
- ไนโตรเจนโดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 7 - 9 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง
- สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ โปรตีน โดยปกติโปรตีนจะเชื่อมต่อกับแมนแนน ฟิวรีนส์ ไพริมิดีน กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น
- ไขมัน
- วิตะมิน
- และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ส่วนมากได้แก่ ฟอสเฟต

ยีสต์ได้เข้ามามีบทบาทกับมนุษย์เป็นเวลานานหลายพันปีแล้ว โดยครั้งแรกรู้จักยีสต์ในฐานะทำให้เกิด "ข้าวเมา" ซึ่งได้มีการกล่าวการขับถึงประวัติศาสตร์บางตอน ยีสต์มีทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษต่อมนุษย์ แต่ส่วนใหญ่รู้จักยีสต์ทางด้านประโยชน์มากกว่าโทษ ประโยชน์ของยีสต์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารมีหลายอย่าง เช่น การทำขนมปัง ,ไวน์ เหล้า, เบียร์, อาหารเสริมโปรตีน เป็นต้น ส่วนโทษของยีสต์นั้นก่อให้เกิดความเสียหายแก่อาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ทำให้อาหารหมักดอง และเครื่องดื่ม มีสี กลิ่น รสเสียหาย ยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปเซลเดียว ขยายพันธุ์ได้ด้วยการแตกหน่อ (budding) เซลล์ยีสต์ที่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะแตกหน่อเป็นสองเซลล์ได้ ภายใน 1 - 2 ชั่วโมง โดยทั่วไปต้องการอุณหภูมิในการเติบโตอยู่ในช่วง 25 - 40 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรด - ด่างระหว่าง 3 - 5 และเจริญได้ทั้งในสภาพมีอากาศและไม่มีอากาศซึ่ง

เป็นขบวนการทางชีวเคมีที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมัก ยีสต์ที่มีบทบาทโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการหมัก มีเพียง 2 จีนัส คือ *Saccharomyces* และ *Candida* (Prescott และ Durn, 1959) ตัวอย่างเช่น *Saccharomyces cerevisiae* หรือเรียกว่า distiller's yeast เหมาะในการใช้หมักเอทิลแอลกอฮอล์ เชื้อนี้นอกจากจะเจริญเติบโตได้เร็วแล้ว ยังสามารถผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ได้มากอีกด้วย

Saccharomyces cerevisiae พวกนี้มีทั้งที่เป็นท็อปยีสต์ (top yeast) ซึ่งเจริญอยู่ที่ผิวหน้าของอาหาร และพวกบอททอมยีสต์ (bottom yeast) ซึ่งจะเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนอยู่ที่ส่วนก้นของถังหมัก สำหรับท็อปยีสต์มีความว่องไวในการหมักมาก และเจริญได้อย่างรวดเร็วที่ 20 องศาเซลเซียส การรวมกลุ่มของเซลล์ และการเกิดคาร์บอนไดออกไซด์อย่างรวดเร็วจะไปดันให้เซลล์ลอยขึ้นอยู่บนผิวหน้าอาหาร ส่วนบอททอมยีสต์กับเซลล์ไม่มีการเกาะกลุ่มและเจริญอย่างช้า ๆ มีความว่องไวในการหมักที่อุณหภูมิต่ำ (10 - 15 องศาเซลเซียส) เนื่องจากไม่มีการรวมกลุ่มของเซลล์ และการเจริญเป็นไปอย่างช้า ๆ ทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์น้อย เซลล์จึงตกตะกอนอยู่ที่ก้นภาชนะ ในการทำเหล้าสาเกของญี่ปุ่น (ไวน์ที่ทำมาจากข้าว) ใช้ยีสต์หมักข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อรา ยีสต์ที่ใช้คือ *Saccharomyces sake* ซึ่งเป็นสายพันธุ์พิเศษของ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเฮกโซสประมาณ 10 - 24 % ให้กลายเป็นกลีเซอรอลได้ โดยทั่วไปยีสต์จะหมักได้อัลกอฮอล์สูงประมาณร้อยละ 12 - 14 แต่ในบางครั้งอาจได้อัลกอฮอล์สูงถึงร้อยละ 18 - 19 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์และสภาพแวดล้อมด้วย ตัวอย่างเช่น *Saccharomyces cerevisiae* หมักจะได้อัลกอฮอล์ร้อยละ 15.1 แต่เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae var.ellipsoideus* จะได้อัลกอฮอล์ร้อยละ 18.4 โดยปริมาตร (Costor , 1954)

การหมักอัลกอฮอล์เป็นขบวนการหมักที่เกิดขึ้นในไซโตปลาสซึมของเซลล์ยีสต์ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสภายในเซลล์ซึ่งได้มาจากอาหารเลี้ยงให้กลายเป็นอัลกอฮอล์ กับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยผ่านวิถีไกลโคไลซีส (Glycolysis) หรือ Embden-Meyerhof-Parnas Pathway (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) ซึ่งตามทฤษฎียีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นอัลกอฮอล์ได้ 51.1 เปอร์เซนต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาล



รูปที่ 2.1 The Embden-Meyerhof-Parnas pathways

ที่มา : Rose (1977)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณแร่ธาตุและวิตะมินในน้ำสับปะรดแช่แข็ง(Tressler และ Joslyn,1971) และสับปะรดปนในเมืองไทย (กรมส่งเสริมการเกษตร,2513) โดยเฉลี่ย

องค์ประกอบ	น้ำสับปะรดแช่แข็ง จำนวนมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม	สับปะรดปน จำนวนมิลลิกรัมต่อ100กรัม
แร่ธาตุ		
แคลเซียม	10.8	22.0
เหล็ก	0.32	0.4
ฟอสฟอรัส	8.3	8.0
แมกเนเซียม	8.9	-
โปตัสเซียม	143.0	-
โซเดียม	0.8	-
วิตะมิน		
กรดแอสคอบิค	13.0	17.0
เบตาคาโรตีน (ไอยู)	0.009	15.0
กรดโฟลิค	0.001	-
กรดแพนโทเทนิค	0.125	-
ไรโบฟลาวิน (บี 2)	0.126	-
ไทอะมีน (บี 1)	0.066	-
ไพริดอกซิน (บี 6)	0.074	-
ไนอาซีน	0.25	0.2

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบทางเคมี น้ำหนักแห้งและจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Aiba , 1968)

จุลินทรีย์	ส่วนประกอบ(% น้ำหนักแห้ง)			จำนวนประชากร (เซลล์/มล.)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัม/100 มล.)	หมายเหตุ
	โปรตีน	กรดนิวคลีอิก	ไขมัน			
ไวรัส	50-90	5-50	< 1	10^8-10^9	0.005*	ไวรัสกับชั้นของไลโปโปรตีนมีไขมัน 25%
แบคทีเรีย	40-70	13-34	10-50	$2x10^8$-$2x10^1$	0.02-2.9	*Mycobacterium* อาจมีไขมัน 30%
ราเส้นใย	10-25	1-3	2-7		3-5	*Aspergillus Sp.* และ*Penicillium sp.* มีไขมัน 50%
ยีสต์	40-50	4-10	1-6	$1-4x10^8$	1-5	*Rhodotorula sp.* และ*Candida sp.* มีไขมัน 50%
สาหร่าย	10-60	1-5	4-80	$4-8x10^7$	0.4-0.9	

* ไวรัสมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 200 มิลลิไมครอน

018117

2.4 การหมักอัลกอฮอล์

การหมักอัลกอฮอล์โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ Single run fermentation เป็นการหมักอัลกอฮอล์โดยใช้น้ำตาลโดยตรง เช่น การหมักไวน์ เป็นต้น และ Parallel run double fermentation ซึ่งเป็นการหมักอัลกอฮอล์โดยใช้แป้งหรือธัญพืชนั้นกระทำการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล และการหมักอัลกอฮอล์แยกกันหรือรวมเป็นขั้นตอนเดียวหมักต่อเนื่องกันไป

การหมักอัลกอฮอล์เป็นขบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ให้เป็นอัลกอฮอล์ การหมักอัลกอฮอล์โดยยีสต์เป็นไปโดยผ่าน Glycolytic of Embden-Meyerhof-Parnas pathway ดังสมการ

$$(C_6H_{12}O_5)_n + n\ H_2O \xrightarrow{\text{enzyme or acid}} n\ C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{yeast}} 2n\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$$

Starch	Hexose	Ethanol	Carbondioxide
162 กรัม	180 กรัม	92 กรัม	88 กรัม
	(100)	(51.1)	(49.8)

ดังนั้นตามทฤษฎีการผลิตอัลกอฮอล์โดยใช้แป้ง 100 กิโลกรัม จะให้ อัลกอฮอล์ 56.78 กิโลกรัม แต่ในทางปฏิบัติร้อยละ 90 - 95 ของแป้งเท่านั้น ที่ถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส ประมาณร้อยละ 95 ของน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น ที่ถูกเปลี่ยนเป็นอัลกอฮอล์ นอกนั้นยีสต์จะใช้สำหรับการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่น ๆ คือ Ethanol 48.4, Carbon dioxide 46.5, Acetaldehyde 0-0.03, Acetic acid 0.05-0.25, Glycerol 2.5-3.6, Lactic acid 0-0.2, Succinic acid 0.5-0.77, Fusel oil 0.25-0.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ นอกจากนี้มี Furfural ปริมาณเล็กน้อย (Harrison,1970)

โดยทั่วไปการหมักอัลกอฮอล์ ยีสต์ที่ใช้มักใช้สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *saccharomyces ellipsoideus* โดยใช้เชื้อ

หมักเริ่มต้น (starter) ในอัตราร้อยละ 2-10 โดยปริมาตร และขั้นตอนในการหมักอัลกอฮอล์ต้องอยู่ในสภาพปลอดเชื้อเสมอ เนื่องจากถ้าเกิดการหมักกรดอะซีติกขึ้นในขณะหมักอัลกอฮอล์แล้ว จะไปยับยั้งการทำงานของยีสต์ และทำให้การหมักอัลกอฮอล์ยุติลง พบว่า ความเข้มข้นของกรดอะซีติกเพียงร้อยละ 0.5 สามารถทำให้ประสิทธิภาพของยีสต์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดโดย *Acetobacter aceti* จะไปออกซิไดซ์อัลกอฮอล์แล้วยังเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็น กรดกลูโคนิค หรือ คีโตกลูโคนิค และโพลีแซคคาไรด์ทำให้เกิดรสชาดผิดปกติขึ้นในไวน์ เช่นเดียวกับแบคทีเรียแลคโตบาซิลัสจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดอะซีติก และกรดแลคติค ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นตอนการผลิตอัลกอฮอล์ จึงมักใช้วิธีเติมเชื้อยีสต์ที่มีความหนาแน่นลงไปในปริมาณสูงมากในตอนเริ่มต้นของการหมัก

การหมักอัลกอฮอล์สามารถดำเนินไปได้ โดยไม่ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าทำการหมักในถังหมักขนาดเล็ก (small vessel) อุณหภูมิการหมักที่เหมาะสมประมาณ 30 องศาเซลเซียส ในกรณีถังหมักมีขนาดใหญ่จำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิหมักโดยใช้ขดหล่อเย็น (cooling coil) หรือเครื่องแลกเปลี่ยนความร้อนจากภายนอกหรือใช้น้ำฉีดพ่นที่รอบนอกของถังหมัก มิฉะนั้นอุณหภูมิในถังหมักจะสูงกว่าอุณหภูมิเหมาะสม การวัดความคืบหน้าของการหมักทำได้โดยการวัดอัตราการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือ วัดปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่โดยใช้บอลลิ่ง หรือบริกซ์ไฮโดรมิเตอร์ (Balling or Brix Hydrometer) แต่ส่วนใหญ่นิยมวัดปริมาณอัลกอฮอล์ในน้ำหมักโดยใช้อีบูลลิโอมิเตอร์ (Ebulliometer) โดยทั่วไปการหมักอัลกอฮอล์ยังคงหมักแบบเป็นครั้งการหมักจนเสร็จสมบูรณ์ระยะเวลาไม่แน่นอน แต่ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 48-72 ชั่วโมง

เมื่อการหมักเสร็จสมบูรณ์แล้ว จะต้องกำจัดเซลล์ยีสต์และวัตถุของแข็งที่กระจัดกระจายในน้ำหมักออกโดยการตกตะกอน สารละลายอัลกอฮอล์ที่ได้ถูกเก็บไว้เพื่อให้เกิดความเสถียร (Stabilization) แล้วนำไปบ่ม (Aging) หรือนำไปหมักกรดอะซีติกโดยตรง

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิต

2.5.1 กล้าเชื้อ

กล้ายีสต์ที่ต้องการต้องอยู่ในระยะที่เชื้อยีสต์กำลังเจริญเติบโตและขยายตัวอย่างรวดเร็ว คือช่วง logarithmic phase เชื้อยีสต์มีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างคงที่และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี (Aiba และ คณะ, 1972) ในอุตสาหกรรมการผลิตอัลกอฮอล์และสุรา นิยมใช้ กล้าเชื้อที่มีความเข้มข้น $1x10^8$ เซลต่อมิลลิลิตร ประมาณ 2-5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เพื่อช่วยลดการปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ และทำให้อัตราการหมักอัลกอฮอล์เร็วขึ้น

2.5.2 อาหารและองค์ประกอบของอาหาร

อาหารที่เชื้อยีสต์สามารถเปลี่ยนให้เป็นอัลกอฮอล์คือ น้ำตาลที่หมักได้ สำหรับการหมักแบบ Single run fermentation ใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 20-25 เปอร์เซนต์ จะได้อัลกอฮอล์ประมาณ 10-15 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งประสิทธิภาพการหมักขึ้นกับสายพันธุ์เชื้อยีสต์ และสภาพแวดล้อมในการหมัก ส่วนการหมักแบบ Parallel run double fermentation ซึ่งมีทั้งการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล และเกิดการหมักอัลกอฮอล์ขึ้นอย่างต่อเนื่องกัน สามารถเตรียมอาหารให้มีความเข้มข้นได้สูงถึง 40 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เช่น การหมักสาเกของญี่ปุ่นใช้ข้าวทั้งหมดคิดเป็น 45 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อสิ้นสุดการหมักได้อัลกอฮอล์ 18-20 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Rose , 1977) ธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลยีสต์ ได้แก่ ไนโตรเจน นิยมเติมในรูปของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย เป็นต้น เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้ยูเรียได้ดีเมื่อมีไบโอตินร่วมอยู่ด้วย (Rose และ Harrison, 1970) นอกจากนี้ ยีสต์ยังสามารถใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยย่อยสลายกรดอะมิโนเป็นแอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ และ higher alcohol โดยยีสต์จะใช้เฉพาะโมเลกุลของแอมโมเนีย ส่วนเกลือแร่และสารอนินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ ฟอสฟอรัส ยีสต์จำเป็นต้องใช้ฟอสฟอรัส ในการสร้าง ATP (Adenosine-5-triphosphate) สังเคราะห์นิวคลีโอโปรตีนและสารอื่น ๆ ซึ่งอาจจะเติมฟอสฟอรัสในรูปของเกลือฟอสเฟต เช่น ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และ ไดโปรแตสเซียมฟอสเฟต

เป็นต้น เกลือเหล่านี้ยังช่วยรักษาสภาพความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ด้วย นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการแมกเนเซียม (Mg^{+}) ที่จำเป็นต่อการหมักอัลกอฮอล์โดยเป็นแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์หลายชนิดใน Embden-Meyerhof-Pathway ส่วนสารอนินทรีย์อื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ได้แก่ โปรตัสเซียม แคลเซียม เหล็ก ทองแดง สังกะสี เป็นต้น และยีสต์ทั่วไปต้องการวิตามินในการเจริญเติบโต ได้แก่ ไบโอติน กรดแพนโททินิคและอินนิซิทอล

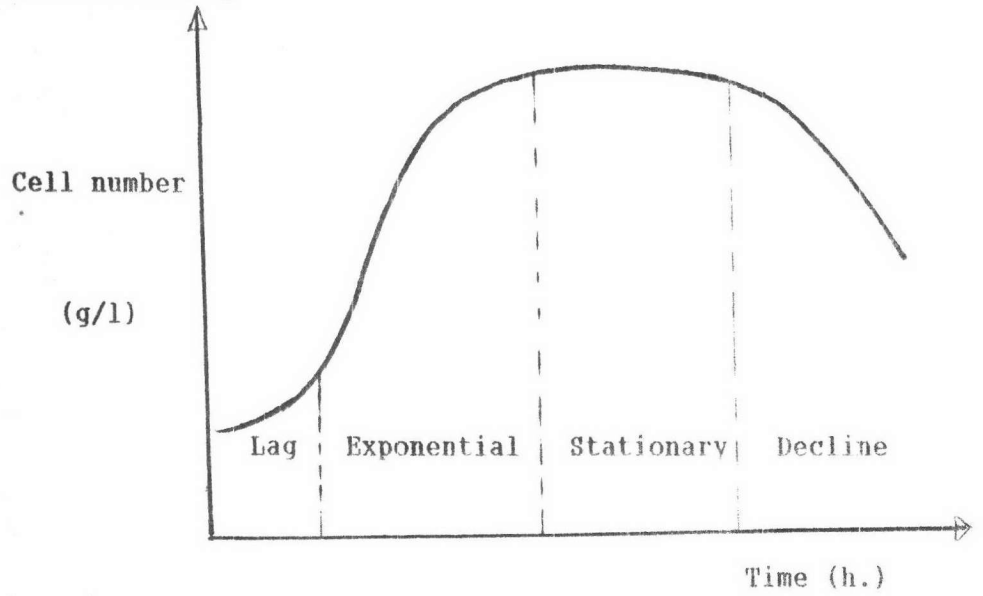
2.5.3 สภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงเชื้อ

สภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงเชื้อที่สำคัญ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ ยีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 3.5-7.0 ค่าความเป็นกรด - ด่างในการหมักอัลกอฮอล์แบบ Parallel run double fermentation จะต้องเหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ในการหมักและมี buffer capacity อยู่ในช่วงที่เอนไซม์และยีสต์สามารถทำงานได้ตลอดกระบวนการหมัก เนื่องจากในกระบวนการหมักอัลกอฮอล์จะมีการสร้างกรดโดยยีสต์

อุณหภูมิที่ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้รวดเร็ว ประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่านี้แต่ไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์จะต่างจาก อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักอัลกอฮอล์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักอัลกอฮอล์อยู่ระหว่าง 14-35 องศาเซลเซียส และขึ้นอยู่กับประเภทของอัลกอฮอล์ เช่น การหมักสาเกนิยมหมักที่อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส และเบียร์หมักที่อุณหภูมิ 8-14 องศาเซลเซียส เป็นต้น เนื่องจากการหมักอัลกอฮอล์มีปฏิกิริยาความร้อนเกิดขึ้น โดยน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะให้ปริมาณความร้อน 26 แคลลอรี่ (Underkofler , 1954) ทำให้อุณหภูมิของถังหมักเพิ่มขึ้น จึงต้องรักษาให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 32 - 33 องศาเซลเซียส โดยวิธีต่าง ๆ เช่น พ่นน้ำเป็นฟองที่ผิวนอก หรือใช้ cooling coil ในถังหมัก

2.6 กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

2.6.1 การหมักแบบกะ(batch process) เป็นระบบปิด(closed system) สารอาหารในระบบมีจำนวนจำกัด เพราะไม่มีการเติมสารอาหาร สภาวะภายในระบบมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักจะมีการเจริญผ่านช่วงระยะของ lag phase ไปสู่ exponential phase จนกระทั่งเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในน้ำหมัก เช่นการเปลี่ยนแปลงของ pH ความเข้มข้นของสารอาหาร และปริมาณสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น จะมีผลทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์หยุดชะงัก นั่นคือ เข้าสู่ stationary phase และ decline phase ซึ่งมีอัตราการตายของจุลินทรีย์มีค่าสูงกว่าอัตราการเจริญ เรียกช่วงลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นว่า กราฟการเจริญเติบโต (growth curve) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้



รูปที่ 2.2 แสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

1. Lag phase เป็นช่วงการปรับตัวของจุลินทรีย์ในสภาวะแวดล้อมใหม่ สามารถทำให้กราฟช่วงนี้สั้นลงได้โดย
   - เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมสมบูรณ์จำนวนมาก
   - ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอายุน้อย และแข็งแรง
   - ใส่จุลินทรีย์จำนวนมาก

2. Exponential phase เป็นช่วงที่อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตลอดเวลา จนกระทั่งถึงจุดการเจริญเติบโตสูงที่สุด สามารถวิเคราะห์สภาวะให้เซลจุลินทรีย์อยู่ในช่วงนี้ได้นานแค่ไหน ขึ้นกับสารอาหารที่จำเป็นมีเพียงพอหรือไม่

3. Stationary phase เป็นช่วงที่เซลจุลินทรีย์ชะงักการเจริญเติบโต เพราะสารอาหารมีน้อยลง เกิดการขาดแคลนอาหาร จุลินทรีย์ที่ไม่ได้รับอาหารก็จะตายไป มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย

4. Decline phase เกิดการขาดแคลนอาหารมากขึ้น จึงทำให้อัตราการตายของจุลินทรีย์มีค่าสูงกว่าอัตราการเจริญ ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลงเรื่อย ๆ ตามเวลาที่เปลี่ยนไป ในที่สุดเท่ากับศูนย์

กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง มีข้อดี ได้แก่

1. เหมาะกับระบบที่มีกำลังผลิตสูง
2. การควบคุมระบบไม่ยุ่งยาก
3. ปลอดจากการปนเปื้อน จึงลดการเสี่ยงต่อการสูญเสีย

กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง มีข้อเสีย ได้แก่

1. เสียค่าใช้จ่ายมากในขั้นตอนเริ่มต้นการหมัก เช่น การทำความสะอาดอุปกรณ์และเครื่องมือ การเตรียมหัวเชื้อที่ดี ค่าแรงในการจ้างคนงาน เป็นต้น
2. เมื่อสิ้นสุดการหมักแต่ละคราว ก็ต้องทำความสะอาดใหม่ทุกครั้ง ทำให้สิ้นเปลืองแรงงานและเสียเวลา
3. ประสิทธิภาพการผลิตต่ำ

ตัวอย่างกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องในการผลิตเอธานอล ได้แก่ งานวิจัย (ศจี ,2528) ซึ่งได้ทำการทดลองผลิตเอธานอลจากน้ำสับปะรดในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ ใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า ยีสต์สามารถผลิตเอธานอลได้ร้อยละ 1.3 ,6.5,9.0 และ 9.2 โดยปริมาตร ภายในเวลา 6 ,16, 21 และ 25 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งในช่วงเวลา 21 ชั่วโมงนี้ มีการผลิตเอธานอล , การเพิ่มปริมาณเซลยีสต์ และการลดลงของน้ำตาลกลินเวิร์ทเป็นไปอย่างรวดเร็ว กราฟค่อน

ข้างเป็นเส้นตรง แต่เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นเกินกว่า 21 ชั่วโมง ปริมาณการผลิตต่ำลง และปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทในน้ำหมักก็ลดลงจนเกือบหมด ขณะเดียวกับ เซลล์ยีสต์ซึ่งมีปริมาณ 290 ล้านเซลต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 13 จะลดปริมาณลงเหลือ 150 ล้านเซลต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 25 ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการหมักแบบกะ ยีสต์มีการเจริญผ่านช่วงระยะต่าง ๆ จนครบวงจรชีวิต (Aiba ,1973) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในน้ำหมักมีผลต่อกิจกรรมของเซลโดยตรง ดังนั้น ประสิทธิภาพในการผลิตเอธานอลจึงลดลง และสามารถคำนวณ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ μ (specific growth rate) (Wang ,1979) ได้จากสมการ

$$\mu = 1/X \cdot dx/dt \qquad (2.1)$$

ซึ่ง X = จำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

t = ระยะเวลาที่ทำการหมัก (ชั่วโมง)

2.6.2 การหมักแบบเฟดแบทช์ (Fed batch fermentation) (Yoshida และคณะ,1973) เป็นการหมักแบบเติมสารอาหารที่จำเป็นอย่างต่อเนื่องแล้วหยุด หรือใส่เป็นครั้งคราวและไม่มีการดึงเอาผลิตภัณฑ์ออกจากระบบจนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของเซล

สำหรับเซล :-

เซลที่สะสม = เซลที่เจริญ

ที่ dt ใด ๆ :

$$Vdx = \mu VX \qquad (2.2)$$

หารด้วย Vdt ตลอด :

$$dX/dt = (\mu - F/V)X \qquad (2.3)$$

$$dX/dt = (\mu - D)X \qquad (2.4)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลของสารอาหารที่ป้อนเข้ามา , ลิตรต่อชั่วโมง

V = ปริมาตรของน้ำหมักในเครื่องปฏิกรณ์ , ลิตร

X = ความเข้มข้นของเซลในเครื่องปฏิกรณ์ , กรัมต่อลิตร

μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ , ชั่วโมง$^{-1}$

ณ จุดที่ อัตราการเจือจาง (D) น้อยกว่า μ_{max} : สารอาหารที่เติมลงไป ถูกใช้จนสมบูรณ์ ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพคงที่ (dx/dt = 0) ทำให้ μ = D แต่เมื่อเวลาผ่านไป V จะเพิ่มขึ้น เพราะไม่มีการดึงเอาน้ำหมักออกจากระบบ ทำให้ค่าอัตราการเจือจางลดลง เพราะ D = F/V แต่ V เมื่อเวลาผ่านไปเป็น V′ ($V' = V + Ft$)

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของสารอาหาร

สำหรับสารอาหาร : -

สารอาหารที่สะสม = สารอาหารที่เติม - สารอาหารที่ถูกใช้ไป

ที่ dt ใด ๆ :

$$VdS = F.S_F - V\mu X/Y_{X/S}\,dt \qquad (2.5)$$

เอา Vdt หารตลอด

$$dS/dt = F.S_F - \mu X/Y_{X/S} \qquad (2.6)$$

เมื่อ S_r = ความเข้มข้นสารอาหารเริ่มต้นในถังหมัก , กรัมต่อลิตร

S = ความเข้มข้นสารอาหารที่เติมลงไป , กรัมต่อลิตร

$Y_{x/s}$ = สัมประสิทธิ์ผลิตผลของเซล (Biomass yield coefficient), กรัมน้ำหนักแห้งของเซลต่อกรัมสารอาหารที่ใช้

เมื่อสารอาหารที่เติมถูกใช้หมด ($ds/dt = 0$) จะได้

$$F.S_r = \mu X/Y_{x/s} \qquad (2.7)$$

เรียกสภาพนี้ว่า quasi - steady state

การหาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ได้ 2 กรณี คือ

(1) กรณีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นคงที่เมื่ออยู่ในสภาวะ quasi -steady state

$$X_m = Y_{p/s} \cdot S_r \qquad (2.8)$$

เมื่อ X_m = ความเข้มข้นของเซลที่สูงที่สุดที่เกิดในถังหมัก , กรัมต่อลิตร

$Y_{p/s}$ = สัมประสิทธิ์ผลิตผลของผลิตภัณฑ์ (Product yield coefficient) , กรัมผลิตภัณฑ์ที่เกิดต่อกรัมสารอาหารที่ใช้

q_p = อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จำเพาะ, กรัมผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นต่อลิตรต่อชั่วโมง$^{-1}$

(2) กรณี q_p คงที่

$$p = p\ V\ /V' + r\ (V\ /V' + Dt/2)t \qquad (2.9)$$

(เมื่อ $r = q_p.Xm$)

เมื่อ p = ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นตามเวลาการหมัก , กรัมต่อลิตร

p = ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมสารอาหารใหม่ลงไป , กรัมต่อลิตร

V = ปริมาตรน้ำหมักเริ่มต้น , ลิตร

V' = ปริมาตรน้ำหมักที่เปลี่ยนไปตามเวลาหมัก , ลิตร

ข้อดีของการหมักแบบ Fed-batch

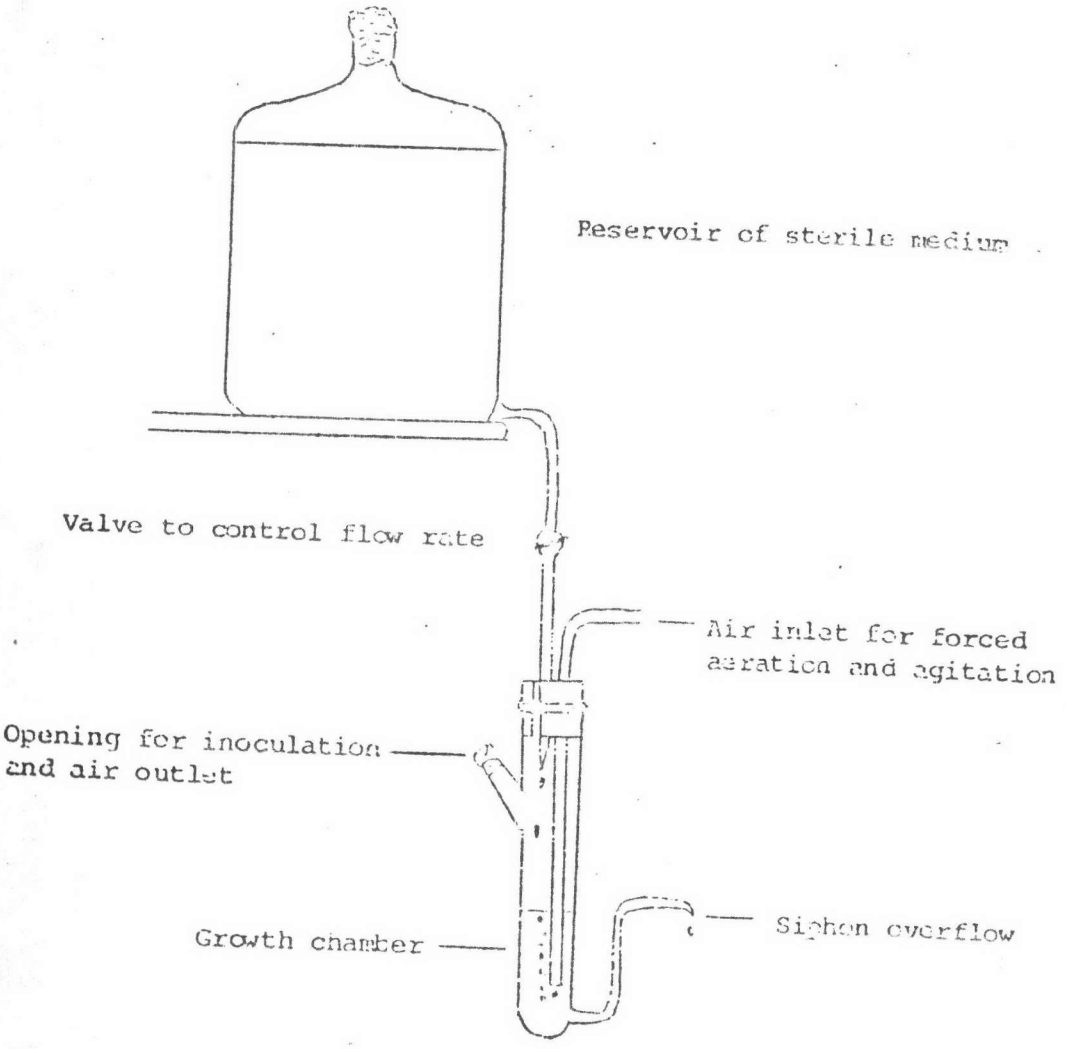
1. ได้จำนวนเซลที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น
2. สามารถหลีกเลี่ยงการยับยั้งที่เกิดจากสารอาหารเริ่มต้น
3. สามารถป้องกันการเกิด Catabolic repression โดยการเติมสารอาหารที่ละน้อยในระหว่างการหมัก
4. สามารถยืดเวลา operation time ได้
5. เป็นระบบที่สามารถใช้กับสายพันธุ์ที่เป็น Auxotrophic mutant

ข้อเสียของการหมักแบบ Fed-batch

1. ต้องระวังการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น เนื่องจากการเติมสารอาหารใหม่ลงไปในระบบ
2. เหมาะกับระบบการหมักที่มีขนาดเล็ก

2.7 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

2.7.1 การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง มีข้อได้เปรียบกว่าการเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องหลายประการ โดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องให้เซลที่มีลักษณะเดียวกัน (uniform) ดังนั้นการศึกษาสรีรวิทยาและพันธุกรรมของจุลินทรีย์จึงใช้วิธีเลี้ยงแบบต่อเนื่อง สามารถศึกษาสภาวะเหมาะต่างๆ ได้แก่ $_{p}H$ อุณหภูมิ การกวน การหมุนเวียนของอากาศ เป็นต้น ในระบบเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะรักษาระดับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะเลี้ยงให้คงที่โดยอัตราเติมเท่ากับอัตราไหลออก โดยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไหลเข้าสู่ภาชนะเลี้ยงในอัตราคงที่ และจะมีการผสมให้เข้ากันระหว่างอาหารใหม่และอาหารเดิมอย่างรวดเร็ว อัตราการเจริญและอัตราการไหลออกของจุลินทรีย์ ซึ่งประชากรของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นแบบต่อเนื่องจะถูกทำให้ลดน้อยลงโดยออกไปกับน้ำหมักที่ไหลออกจากถังหมัก ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแวดล้อมหนึ่งที่กำหนดให้ specific growth rate (μ) คงที่ จะต่ำกว่า อัตราการเจริญ μ_{max} (อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด) ถ้าหากว่าค่าอัตราการเจือจาง มากกว่า μ_{max} อัตราการเจริญจะมีค่าเป็นลบ ในสภาพเช่นนี้ประชากรจุลินทรีย์ในภาชนะเลี้ยงจะลดลง ถ้าอัตราการเจือจางมีค่าน้อยกว่า μ_{max} ค่าของอัตราการเจริญจะเป็นบวกและจำนวนของประชากรจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์จะต่อเนื่องกัน จนกว่าอัตราการเจริญจะถูกจำกัดโดยความเข้มข้นของสารอาหารที่เข้าไปในภาชนะเลี้ยงเชื้อ ณ จุดนี้อัตราการเจือจางเท่ากับอัตราการเจริญ ปริมาณประชากรจุลินทรีย์ในภาชนะเลี้ยงจะคงที่ ลักษณะการเลี้ยงจุลินทรีย์เช่นนี้เป็นหลักพื้นฐานของการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง และเป็นแบบที่นิยมใช้กัน (ดูรูปที่ 2.3 แผนภาพแบบง่ายๆของการเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง) อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญในภาชนะเลี้ยงจะไม่สูงถึงอัตราสูงสุด แต่สามารถรักษาให้อยู่ในสภาพที่มีค่าใกล้เคียงค่าสูงสุด (submaximal) ซึ่งจะหาค่าได้โดยค่าความเข้มข้นสมดุลของสารอาหารจำกัด (steady state concentration of the limiting-nutrient) ความเข้มข้นของสารอาหารจำกัดนั้นหาจากอัตราการเจือจาง ถ้าอัตราการไหลเข้าของสารอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้น ถ้าอัตราการไหลลดลงอัตราการเจริญก็จะลดลงไปด้วย จากการเปลี่ยนแปลงของอัตราการไหลทำให้สามารถหาอัตราการเจริญได้กว้างขึ้น คือ สามารถที่จะหาได้ตั้งแต่ มีค่าเป็นศูนย์จนถึงครึ่งหนึ่ง



รูปที่ 2.3 แผนภาพแบบง่าย ๆ ของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

μ_{max} นอกจากนี้ยังสามารถหาเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัว (generation time), $G = 0.692/\mu$ (เมื่อเซลมีชีวิต 100%) ดังนั้น ที่สภาวะสมดุล ประชากรจุลินทรีย์ในภาชนะเลี้ยงจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารอาหารจำกัดการเจริญที่มีอยู่ในอาหารที่ไหลเข้าสู่ภาชนะเลี้ยง

2.7.2 รูปแบบระบบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

ระบบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องอาจจำแนกได้หลายแบบ โดยพิจารณาลักษณะธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยา และชีวเคมีในกระบวนการหมักชนิดนั้นๆ เป็นพื้นฐาน สามารถแบ่งกระบวนการหมักได้เป็น 2 แบบ (Wang, 1979) คือ

1. ผลิตเซลของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ต้องการ

2. ผลิตสารเคมี ซึ่งอาจจะเกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นโดยจุลินทรีย์ หรืออาจได้จากการย่อยสลายสารอาหารในน้ำหมักไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

ในแง่ของวิศวกรรมเคมี อาจจำแนกได้เป็น 2 ระบบ(Herbert ,1961) ดังนี้

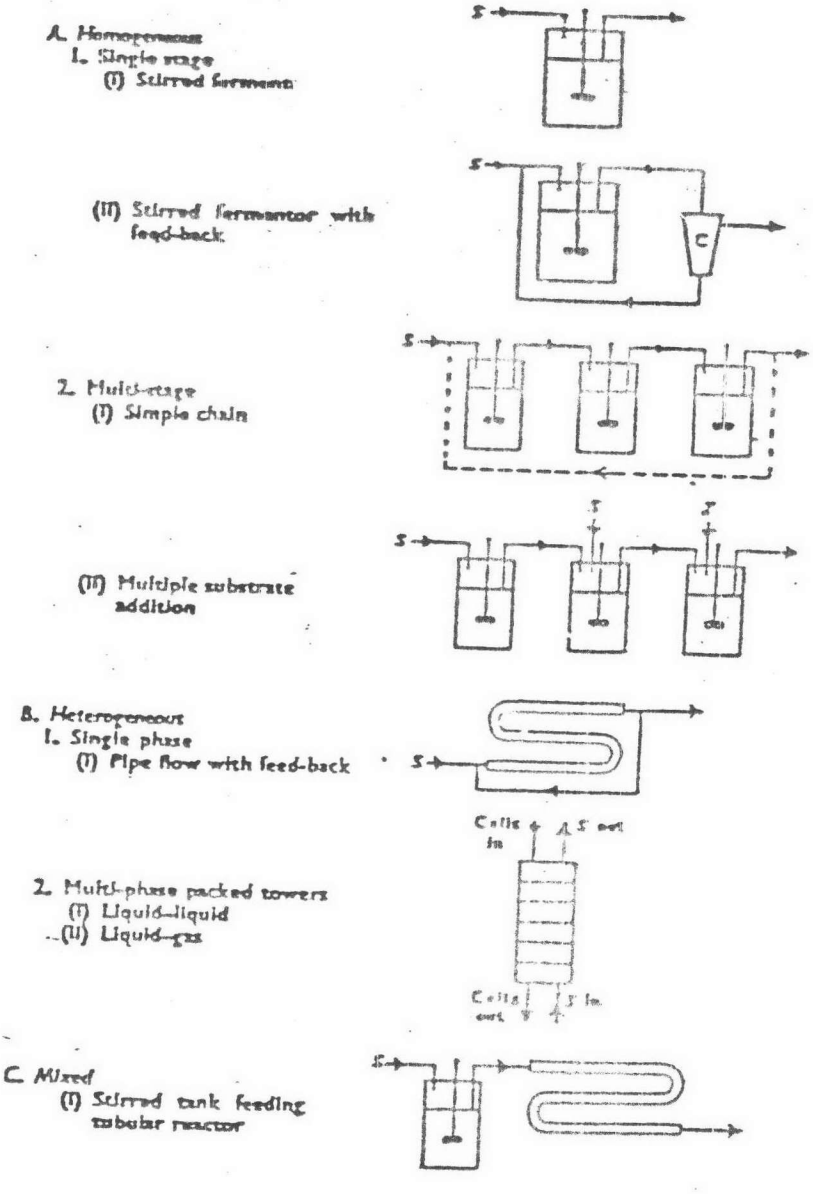
1. Homogeneous system ระบบนี้จัดได้ว่ามีส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำหมักกระจายอย่างสม่ำเสมอ จุลินทรีย์มีลักษณะทางสรีรวิทยาเท่าเทียมกันโดยตลอด ในขณะที่การหมักอยู่ในสภาวะสมดุล (ตัวอย่างเช่น การหมักด้วยเครื่องหมักระบบแอร์ลิฟท์)

2. Heterogeneous system ในระบบนี้ถึงแม้ว่าจะอยู่ในสภาวะสมดุล ความเข้มข้นของเซล ความเข้มข้นของสารอาหารและผลิตภัณฑ์ในแต่ละจุดจะแตกต่างกัน และจุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ตามตำแหน่งต่าง ๆ ในระบบก็มีความแตกต่างกัน ทั้งทางด้านสรีรวิทยาและความสามารถในการเจริญเติบโต หรือการผลิตผลิตภัณฑ์

นอกจากนี้ Herbert, D. (1961) ได้จำแนกระบบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเป็น 2 ระบบใหญ่ ๆ คือ ระบบเปิด (Open system) และ ระบบปิด (closed system) ดังแสดงในรูป 2.4 และ 2.5

(1.) ระบบเปิด หมายถึงระบบที่จุลินทรีย์ในน้ำหมักจะไหลออกมาพร้อมกับผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา

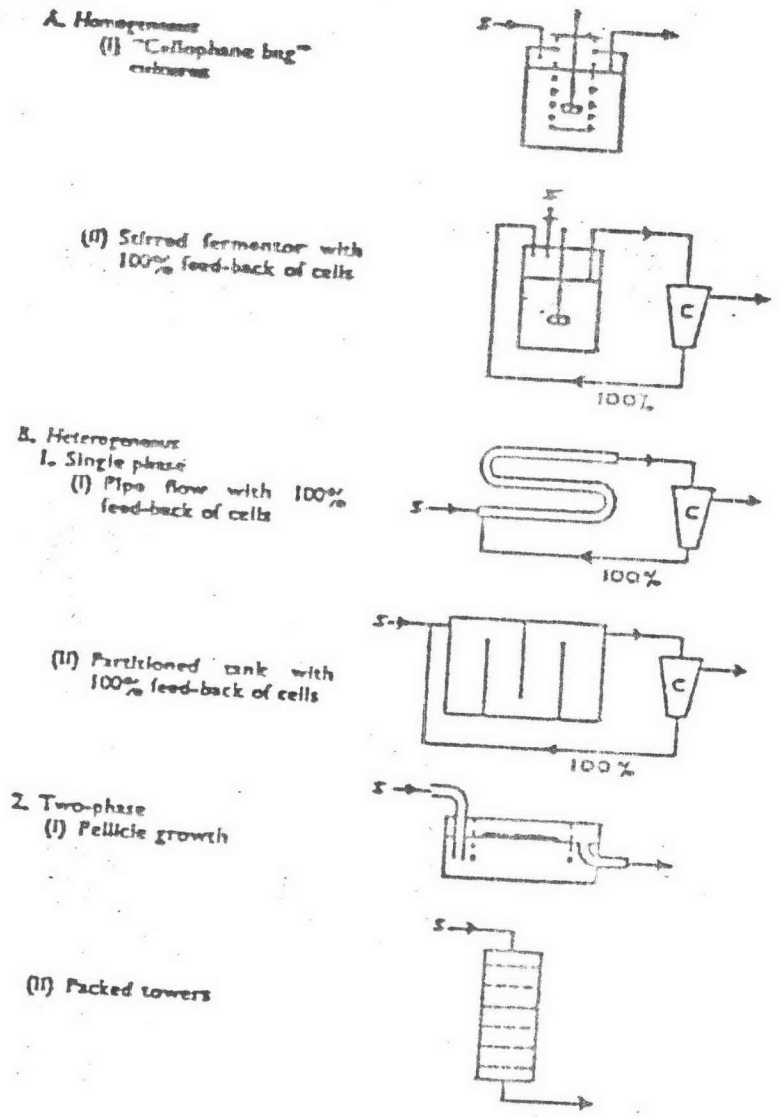
(2) ระบบปิด จุลินทรีย์จะถูกกักให้อยู่ภายในเครื่องหมัก ทั้งนี้อาจจะใช้วิธีกรองไม่ให้จุลินทรีย์ผ่านมากับผลิตภัณฑ์ หรือทำให้จุลินทรีย์ตายไม่สามารถเจริญเติบโตได้ตลอดเวลา ซึ่งกระบวนการหมักทั้ง 2 ระบบนี้ สามารถแบ่งย่อยออกไปเป็นระบบ Homogeneous ระบบ heterogeneous และระบบผสม ซึ่งในแต่ละระบบจัดให้เป็นแบบ Single stage หรือ Multi-stage ก็ได้



รูปที่ 2.4 การจัดจำแนกกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในระบบเปิด

S, Z = การไหลเข้าของสารอาหาร

C = เครื่องเหวี่ยงแบบต่อเนื่องหรือถังตกตะกอน



รูปที่ 2.5 การจัดจำแนกกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในระบบปิด

S = การไหลเข้าของสารอาหาร

C = เครื่องเหวี่ยงแบบต่อเนื่องหรือถังตกตะกอน

2.8 ทฤษฎีของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

การหมักแบบต่อเนื่อง เป็นระบบที่การเจริญของจุลินทรีย์อยู่ในระบบเปิด ที่จำนวนจุลินทรีย์ถูกรักษาให้อยู่ในสภาพการเจริญที่สมดุลอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นสภาวะที่มีอัตราการเจริญและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุด พร้อมกับจัดให้ปัจจัยสำคัญในน้ำหมัก เช่น จำนวนเซลจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของสารอาหารหลักอยู่ในระดับคงที่ที่เหมาะสม ทั้งนี้สามารถทำได้โดยการป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมัก พร้อมกับการปล่อยน้ำหมักออกจากถังหมักในอัตราเดียวกัน โดยมีการกวนน้ำหมักอย่างดี และอัตราการไหลผ่านของน้ำหมักจะต้องพอเหมาะที่จะทำให้อัตราการเพิ่มของเซลเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์เท่ากับอัตราการไหลออกของเซล ส่วนอัตราการเพิ่มสารอาหารเข้าสู่ถังหมักเท่ากับอัตราการใช้สารอาหาร โดยจุลินทรีย์ในน้ำหมักและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับอัตราการไหลออกของผลิตภัณฑ์ในน้ำหมัก (Aiba, 1965)

ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. เคโมสแตท (Chemostat) เป็นระบบที่ป้อนสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญในอัตราที่คงที่ เป็นผลให้ความหนาแน่นและอัตราการเจริญของเจริญของจุลินทรีย์มีการปรับตัวเองไปตามสารอาหารที่ป้อนเข้ามา

2. เทอร์บิโดสแตท (Turbidostat) เป็นระบบที่ควบคุมให้ความหนาแน่นของเซลคงที่ โดยการป้อนน้ำหมักใหม่เข้ามาตามที่ต้องการ

ทั้ง 2 ระบบแสดงในรูปที่ 2.13 แม้ว่าระบบทั้ง 2 มีการควบคุมอัตราการเจริญแตกต่างกัน แต่ก็มีความซับซ้อนทั้งคู่ และสามารถอธิบายได้โดยใช้สมการจลนศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน

ระบบดังกล่าวมีความต้องการพื้นฐานเหมือนกัน คือ วิธีการควบคุมให้ปริมาตรของปฏิกรณ์ชีวภาพคงที่ ซึ่งมีหลายวิธี วิธีที่ง่ายที่สุด คือ การใช้ท่อไหลล้น (overflow tube) หรือใช้ขอบกั้นที่มีความสูงคงที่อยู่ภายในเครื่องปฏิกรณ์ ดังนั้นเมื่อมีการป้อนน้ำหมักใหม่เข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ น้ำหมักที่มีปริมาตรเท่ากับจะไหลผ่านท่อแล้วไหลล้นสู่ถังเก็บตามแรงโน้มถ่วงโลก นอกจากนี้อาจต่อปั๊มเข้ากับท่อทางออกของน้ำหมัก และควบคุมอัตราการปั๊มออกให้เท่ากับอัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก

ส่วนวิธีที่ซับซ้อนนั้น คือ วางเครื่องปฏิกรณ์ทั้งหมดบนเครื่องชั่ง และพยายามควบคุมให้น้ำหนักของเครื่องปฏิกรณ์คงที่ โดยการควบคุมอัตราการปั๊มน้ำหมักออก

ในระบบการหมักแบบเทอร์บิโดสแตทมีการติดตั้งระบบการวัดเซลด้วยแสง (photo cell system) ซึ่งทำหน้าที่วัดความหนาแน่นของเซลอย่างต่อเนื่อง และรักษาความหนาแน่นของเซลให้คงที่โดยการควบคุมอัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก

นอกจากการควบคุมการไหลเข้าออกของน้ำหมักให้คงที่แล้ว ยังต้องควบคุมสิ่งแวดล้อมสำคัญอื่น ๆ ด้วย ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักเป็นต้น

เนื่องจากระบบการหมักแบบเคโมสแตทเป็นระบบหมักที่ใช้ทั่วไปมากที่สุด ดังนั้นจึงจะกล่าวอธิบายรายละเอียดของระบบเคโมสแตท ซึ่งทฤษฎีดังกล่าวยังสามารถใช้อธิบายระบบหมักแบบเทอร์บิโดสแตทได้อีกด้วย

2.8.1 ทฤษฎีเกี่ยวกับระบบหมักแบบเคโมสแตท

ในระบบหมักแบบเคโมสแตท อัตราการเจริญสามารถหาได้โดยแปรค่าอัตราการป้อนสารอาหารที่จำเป็น ซึ่งอาจเป็นคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือวิตามิน โดยสารอาหารจำเป็นดังกล่าวต้องมีอยู่มากเกินพอ ความสามารถในการแปรค่าอัตราการเจริญโดยการเปลี่ยนอัตราการป้อนสารอาหาร เป็นข้อได้เปรียบมากที่สุดของการหมักแบบต่อเนื่องที่มีต่อการหมักแบบเป็นครั้ง และยังเป็นสิ่งที่อธิบายคุณสมบัติเฉพาะของเคโมสแตทอีกด้วย โดยการควบคุมให้อัตราการป้อนสารอาหารคงที่ เป็นการควบคุมระบบการหมักให้มีการเจริญอยู่ในสภาวะคงที่ (Marison, 1988)

2.8.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของเซล

คุณสมบัติเฉพาะของเคโมสแตท (Chemostat) และการเจริญที่สภาวะคงที่สามารถแสดงได้โดยใช้สมการต่อไปนี้ ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลและความเข้มข้นของสารอาหารกับอัตราการป้อนสารอาหารหรืออัตราการเจือจาง สมการดังกล่าวได้จากการทำสมดุลมวลสารของเซลและสารอาหารในเครื่องปฏิกรณ์

สำหรับเซล:-

เซลที่สะสม = เซลเข้า - เซลออก + เซลที่เจริญ - เซลที่ตาย

ที่ dt ใด ๆ :

$$Vdx = FX_0dt - FXdt + V\mu Xdt - V_dXdt \quad (2.10)$$

หารด้วยVdtตลอด:

$$dx/dt = FX_o/V - FX/V + \mu X - \alpha X \qquad (2.11)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลของสารอาหารที่ป้อนเข้ามา, ลิตรต่อชั่วโมง

V = ปริมาตรของน้ำหมักในเครื่องปฏิกรณ์, ลิตร

X_o = ความเข้มข้นของเซลในสารอาหารที่ป้อนเข้ามา, กรัมต่อลิตร

X = ความเข้มข้นของเซลในเครื่องปฏิกรณ์, กรัมต่อลิตร

μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, ชั่วโมง$^{-1}$

α = อัตราการตายจำเพาะ, ชั่วโมง$^{-1}$

สำหรับกรณีเคโมสแตทขั้นตอนเดียว เนื่องจากสารอาหารที่ป้อนเข้ามามีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ดังนั้น $X_o = 0$ และไม่มีการคืนเซลกลับมาใช้ ส่วนเซลที่อยู่ในระบบมีอัตราการเจริญเติบโตสูงมาก เพราะมีสารอาหารเพียงพอ และอัตราการตายของเซลต่ำมากเมื่อเทียบกับอัตราการเจริญเติบโต $\mu >> \alpha$ จึงจัดรูปสมการ 2.11 ได้เป็น

$$dx/dt = \mu X - FX/V \qquad (2.12)$$

ค่า F/V คือ อัตราการเจือจาง (D) มีหน่วย ต่อชั่วโมง หมายความว่า ปริมาตรน้ำหมักที่ไหลผ่านเครื่องปฏิกรณ์ในเวลา 1 ชั่วโมง จากสมการ 2.12 เขียนใหม่ได้ดังนี้

$$dx/dt = \mu X - DX = (\mu - D)X \qquad (2.13)$$

สมการ (2.13) แสดงให้เห็นว่า ถ้าแปรค่าอัตราการป้อนสารอาหารแล้ว อัตราการเจริญเติบโตมีการแปลี่ยนแปลงตามไปด้วย ซึ่งความสัมพันธ์นี้ใช้ได้จนถึงจุดที่ $D > \mu_{max}$ (อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด) เนื่องจากเมื่อ $D > \mu_{max}$ ภายใต้สภาวะดังกล่าว สารอาหารมีมากเกินพอและเหลือ $(\mu - D)$ มีค่าเป็นลบ ผลที่ตามมา คือความเข้มข้นของเซลลดลง และเกิดการชะล้างออกจากระบบ ในทางปฏิบัติอัตราการเจือจางวิกฤต (D_c) จะมีค่าประมาณเท่ากับค่า μ_{max}

ในช่วงการเจริญที่สภาวะคงที่ (steady state) ค่า $dx/dt = 0$ เมื่อแทนในสมการ 2.13 จะได้ดังนี้

$$0 = \mu X - DX \qquad (2.14)$$

$$\mu = D \qquad (2.15)$$

จะเห็นได้ว่า ที่สภาวะความเข้มข้นของเซลคงที่ ค่าอัตราการป้อนสารอาหาร มีค่าเท่ากับ ค่าอัตราการเจริญของเซล

เมื่อให้อัตราการเจือจางเข้าใกล้ D_c ระบบหมักแบบเคโมสแตท จะมีความเสถียรลดลง เนื่องจากถ้ามีการเปลี่ยนแปลงค่า X อย่างมากมาย ทำให้เกิดสภาวะไม่คงที่ซึ่งนำไปสู่การชะล้างเซลออกจากระบบอย่างรวดเร็ว ดังนั้น ข้อเสียเปรียบที่สำคัญของเคโมสแตท คือ ใช้งานได้ดีที่อัตราการเจือจางต่ำ ๆ ซึ่งทำให้การเปลี่ยนแปลงค่า X และ S มีเพียงเล็กน้อย และการเปลี่ยนค่าอัตราการไหลก็มีผลเสียเล็กน้อยต่อสภาวะคงที่

สำหรับเทอร์บิโดสแตท ซึ่งเป็นระบบที่มีการรักษาความหนาแน่นของเซลโดยการควบคุมอัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก เพราะฉะนั้นระบบจึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่า X แม้เพียงเล็กน้อย และทำงานได้ดีที่อัตราการเจือจางสูง ๆ ดังนั้นเคโมสแตทและเทอร์บิโดสแตทจึงเป็นสิ่งที่ประกอบกันให้สมบูรณ์

2.8.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของสารอาหาร

ความสัมพันธ์ดังกล่าว ได้จากการทำสมดุลมวลสารรอบระบบเคโมสแตท โดยพิจารณาสารอาหาร (The balance for growth-limitling substrate)

สารอาหารที่สะสม = สารอาหารเข้า - สารอาหารออก - สารอาหารที่ถูกใช้ไป - สารอาหารที่ใช้ในการเก็บรักษา - สารที่เกิดขึ้น

ที่ dt ใด ๆ:

$$Vds = FS_r dt - FSdt - V\mu X/Y_{X/S}\, dt - V\, mXdt - Vq_p X/Y_{p/s}\, dt \qquad (2.16)$$

เอา Vdt หารตลอด ;

$$dS/dt = FS_r/V - FS/V - \mu X/Y_{X/S} - mX - q_p X/Y_{p/s} \qquad (2.17)$$

เมื่อ S_r = ความเข้มข้นของสารอาหารในถังเก็บ, กรัมต่อลิตร

S = ความเข้มข้นของสารอาหารในระบบเคโมสแตท, กรัมต่อลิตร

$Y_{X/S}$ = สัมประสิทธิ์ผลิตผลของเซล (Biomass yield coefficient), กรัมน้ำหนักแห้งของเซลต่อกรัมสารอาหารที่ใช้

1179226198

$Y_{p/s}$ = สัมประสิทธิ์ผลิตผลของผลิตภัณฑ์ (Product yield coefficient), กรัมผลิตภัณฑ์ที่เกิดต่อกรัมสารอาหารที่ใช้

m = ความต้องการพลังงานในการเก็บรักษาหรือเลี้ยงชีพ (manitenance requirment), กรัมสารอาหารที่ใช้ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเซลต่อชั่วโมง

q_p = อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จำเพาะ, กรัมผลิตภัณฑ์ที่เกิดต่อลิตรต่อชั่วโมง

โดยทั่วไป ค่า $mX << \mu X/Y_{X/S}$ สามารถตัดทิ้งได้ และเมื่อพิจารณากรณีที่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ ค่า $q_p = 0$ ดังนั้นสมการ (2.17) จะเหลือ

$$dS/dt = FS_r/V - FS/V - \mu X/Y_{X/S} \qquad (2.18)$$

ที่สภาวะคงที่ (steady state) ค่า $dS/dt = 0$ จะได้ว่า

$(D = F/V)$; $$0 = DS_r - DS - \mu X/Y_{X/S} \qquad (2.19)$$

$$\mu X/Y_{X/S} = D(S_r - S) \qquad (2.20)$$

และที่สภาวะคงที่ ค่า μ = D จากสมการ (2.15) สามารถจัดรูปได้ใหม่ดังนี้

$$X = Y_{X/S}(S_r - S) \qquad (2.21)$$

เมื่อ S = ความเข้มข้นสารอาหารในระบบเคโมสแตท ที่สภาวะคงที่

X = ความเข้มข้นของเซลในระบบเคโมสแตท ที่สภาวะคงที่

จากสมการ (2.21) มีการตั้งสมมุติฐานว่า ค่าสัมประสิทธิ์ผลิตผล Y (yield coefficient) ไม่ขึ้นกับอัตราการเจริญ ซึ่งใช้ไม่ได้กับทุกกรณี และยังสมมุติอีกว่า ค่า X ไม่ขึ้นกับสารอาหารอื่นใด ยกเว้นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญ (growth-limiting nutrient)

2.8.4 <u>สมการพื้นฐานสำหรับการหมักแบบต่อเนื่อง</u>

จากสมการที่ (2.20),(2.21) เป็นสมการที่สภาวะคงที่ อธิบายระบบการหมักแบบต่อเนื่อง แต่ก็พยายามแบบจำลองมาอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง X และ S โดยนำไปสัมพันธ์กับตัวแปรที่รู้ค่า คือ D (dilution rate) ทำได้โดยแทนค่าในสมการของ Monod

จาก $$\mu = \mu_{max} S/K_S+S \qquad (2.22)$$

ค่า μ_{max} = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารไม่มีขอบเขตจำกัด

K_S = ค่าคงที่ (saturated constant) มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับระบบที่สภาวะคงที่ (steady state)

ค่า $dX/dt = 0$ และ $dS/dt = 0$ ดังนั้นค่า X และ S จึงเป็นค่าคงที่

จากสมการ (2.22) $S = \mu K_S/(\mu_{max} - \mu)$ (2.23)

แทนค่า S และ $\mu = D$ ลงใน (2.23)

$$S = DK_S/(\mu_{max} - D) \quad (2.24)$$

ในสมการ (2.24) แสดงว่า S เป็นฟังก์ชันกับ D เท่านั้น

จากสมการ (2.21) ที่สภาวะคงที่ จะได้

$$X = Y_{X/S}(S_r - S) \quad (2.25)$$

แทนค่า S จากสมการ (2.24) ลงในสมการ (2.25) จะได้ว่า

$$X = Yx/s\ [S_r - (DK_S/\mu_{max} - D)] \quad (2.26)$$

ส่วนสมการ (2.26) แสดงให้เห็นว่า X เป็นฟังก์ชันกับ D และ S_r

2.8.5 อัตราการเจือจางวิกฤต

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นว่า อัตราการเจือจางวิกฤต, D_C คือ ค่า D ที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดการชะล้างเซลออก โดยทั่วไป D_C มีค่าประมาณเท่ากับ μ_{max} อย่างไรก็ตาม $D_C = \mu$ เมื่อ $S = S_r$ เนื่องจากเมื่อเกิดการชะล้างเซล จะไม่มีเซลเหลืออยู่ในระบบหมักเคโมสแตท ดังนั้นจึงไม่มีการใช้สารอาหาร เขียนได้ว่า

$$D_C = \mu_{max}\ S_r/K_S+S_r \quad (2.27)$$

จากสมการ (2.27) เห็นได้ว่าค่า D_C เป็นฟังก์ชันกับ S_r เมื่อ S_r มีค่ามาก ถ้าเทียบกับ K_S อาจเขียนเป็น

$$D_C = \mu_{max}\ S_r/S_r = \mu_{max} \quad (2.28)$$

อย่างไรก็ตาม เมื่อ S_r ลดลง เทอม K_S ตัดทิ้งไม่ได้ แล้ว D_C จะมีค่าน้อยกว่า μ_{max}

2.8.6 กำลังการผลิต

ในการหมักแบบต่อเนื่องกำลังการผลิตเซล (Biomass - productivity), PX (กำลังต่อลิตรต่อชั่วโมง) จะเท่ากับ

$$PX = DX \quad (2.29)$$

แทนค่า X ด้วยสมการ (2.26) จะได้

$$PX = DY_{X/S} \left(S_r - K_S D/ \mu_{max} - D \right) \quad (2.30)$$

นั่นคือกำลังการผลิตเป็นฟังก์ชัน กับอัตราการเจือจาง (ดังรูป 2.15) ค่าอัตราการเจือจางที่ทำให้ได้กำลังการผลิตสูงสุด หรือ D_{max} อาจคำนวณได้โดยให้สมการอนุพันธ์อันดับ 1 ของสมการ (2.30) เท่ากับ 0 จะได้ว่า

$$D_m = D_C \left[1 - (K_S/K_S+S)^{1/2} \right] \quad (2.31)$$

อัตราการเจือจางที่ทำให้ได้กำลังการผลิตสูงสุด มักไม่ใช่ค่าเดียวกับที่ทำให้ได้ผลิตผลสูงสุด เพราะฉะนั้นในการพิจารณากำลังการผลิตอาจจะต้องพิจารณาถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมักที่ออกไปด้วย

กำลังการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สัมพันธ์กับการเจริญ (productivity of growth related products, P_p) สามารถเขียนได้ในทำนองเดียวกัน คือ

$$P_p = D_p \quad (2.32)$$

เมื่อ p = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่สภาวะคงที่, กรัมต่อลิตร

2.8.7 <u>การหาค่าผลิตผลและค่าคงที่อัตราเร็ว</u>

เนื่องจากเป็นการยากที่จะรักษาความเสถียรของสภาวะคงที่ เมื่อเข้าใกล้ค่า μ_{max} วิธีการง่ายที่สุดในการหาค่า μ_{max} คือใช้สมการของ Monod แล้วแก้หาค่า K_S

$$D = \mu_{max} S/K_S+S \quad (2.33)$$

และ

$$K_S = S (\mu_{max} - D)/D \quad (2.34)$$

ทำการควบคุมระบบหมักเคโมสแตทให้ทำงานที่สภาวะเหมือนกัน แต่แปรค่าอัตราการเจือจางต่ำ ๆ 2 ค่า แล้วหาค่า S สำหรับแต่ละค่า D จึงสามารถแก้สมการหาค่า μ_{max} ได้ดังต่อไปนี้

$$S_1(\mu_{max}-D_1)/D_1 = S_2(\mu_{max}-D_2)/D_2 \quad (2.35)$$

เมื่อรู้ค่า μ_{max} ก็หาค่า K_S โดยแทนค่า μ_{max} ลงในสมการ (2.34)

ผลิตผลของเซล (Biomass yield, $Y_{X/S}$) สามารถหาได้ที่แต่ละสภาวะคงที่ โดยการวัดค่า S และ X จากสมการ

$$Y_{X/S} = X/(S_r-S) \quad (2.36)$$

ในระบบการหมักชนิดเคโมสแตท ภายใต้สภาวะที่คาร์บอนเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ เมื่อทำการเขียนกราฟระหว่าง $1/Y_{x/s}$ กับ $1/D$

จะได้สมการเส้นตรงมีความชันเท่ากับ m หรือพลังงานที่ต้องใช้ในการเก็บรักษา(ดังแสดงในรูป 2.16) ความชันดังกล่าวไม่ได้ผ่านจุดกำเนิดเนื่องจากเซลต้องใช้สารอาหารส่วนหนึ่งในการรักษาเซลให้มีความมั่นคงและอยู่รอดได้ และจากสมการของ Pirt ที่ว่า

$$1/Y_{x/s} = m/\mu + 1/Y_g \qquad (2.37)$$

ที่สภาวะคงที่ $D = \mu$ ดังนั้นจุดตัดแกน $1/Y_{x/s}$ จึงมีค่าเท่ากับ $1/Y_g$

เมื่อ Y_g = ผลิตผลของการเจริญจริง (true growth yield)

จะเห็นได้ว่า ค่าต่าง ๆ เช่น μ_{max}, K_s และ m ซึ่งหาได้ยากในการหมักแบบเป็นครั้งนั้น สามารถหาได้โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการทดลองหมักที่สภาวะคงที่

2.8.8 การปรับปรุงระบบเคโมสแตทพื้นฐาน

เป็นเวลานานมาแล้วที่มีแต่การกล่าวถึงเคโมสแตท ทั้งในทางทฤษฎีและปฏิบัติโดยไม่ได้มีการปรับปรุง ต่อมาได้ทำการปรับปรุงประสิทธิภาพของเคโมสแตทโดยการนำเอาเซลในน้ำหมักที่ไหลออกกลับมาป้อนย้อนกลับเข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ หรือโดยการใช้ระบบเคโมสแตทจำนวนหนึ่งมาต่ออนุกรมกัน

การนำเซลมาป้อนย้อนกลับเป็นวิธีการสำคัญ ในการเติมเชื้ออย่างต่อเนื่องลงในเคโมสแตท เพื่อรักษาระบบให้เสถียรและเป็นการทำให้การรบกวนระบบเนื่องจากการใช้ $D > \mu_{max}$ ลดน้อยลง และข้อดีอื่น ๆ ของการนำเซลมาป้อนย้อนกลับก็คือ ทำให้เครื่องสามารถทำงานที่สภาวะเข้าใกล้ D_{max} ซึ่งเป็นค่าอัตราการเจือจางที่ทำให้เกิดเซลมากที่สุดโดยปราศจากสารอาหารเหลือใช้ในน้ำหมักที่ทางออก ซึ่งปกติที่สภาวะ D_{max} นั้นจะมีสารอาหารเหลืออยู่ในน้ำหมักที่ทางออก เมื่อมีการนำเซลมาป้อนย้อนกลับจะช่วยรักษาความเข้มข้นของเซลที่มากขึ้นที่สภาวะคงที่ ซึ่งมีผลทำให้สามารถใช้สารอาหารเต็มขึ้น รูปแบบดังกล่าวมีประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากทำให้ค่า COD ลดลง ในอัตราที่สูงกว่าการขาดการนำเซลมาป้อนย้อนกลับ

แผนผังแสดงระบบหมักเคโมสแตทที่มีการนำเซลมาป้อนย้อนกลับ แสดงอยู่ในรูป2.17 ทฤษฎีที่ใช้คล้ายกับทฤษฎีเคโมสแตทพื้นฐาน เว้นแต่ว่ามีเทอมเพิ่มเข้ามา 2 เทอม คือ อัตราส่วนการป้อนย้อนกลับ (recycle ratio, r) และ C' เป็นแฟคเตอร์ซึ่งนำน้ำหมักขาออก

มาทำให้เข้มข้นก่อนป้อนกลับสู่เคโมสแตท ทำสมดุลมวลสารของเซลและสารอาหารรอบเครื่องหมักและเครื่องทำเซลให้เข้มข้น (seperator) ได้เป็น

สำหรับเซล

เซลสะสม = เซลเข้า + เซลที่ป้อนย้อนกลับ + เซลที่เจริญ - เซลออก

$$dX/dt = FX_0/V + \gamma FC'X/V + \mu X - (1+\gamma)FX/V \quad (2.38)$$

เซลที่เก็บรักษาและเซลที่ตายสามารถตัดทิ้งได้ ถือว่าน้อยมาก

ภายใต้สภาวะคงที่ (steady state) $dX/dt = 0$ และ $D = F/V$ จัดรูปสมการใหม่เป็น

$$\mu = D(1+\gamma-\gamma C') \quad (2.39)$$

จากสมการ(2.39)แสดงให้เห็นว่า ค่า D จะมีค่าน้อยกว่า μ เสมอ เนื่องจาก C' จะมีค่ามากกว่า 1 ทำให้เทอม $(1+\gamma-\gamma C')$ มีค่าน้อยกว่า 1 เสมอ

สำหรับสารอาหาร

สารอาหารสะสม = สารอาหารในน้ำหมักที่ป้อน + สารอาหารในน้ำหมักย้อนกลับ - สารอาหารที่ใช้ - สารอาหารที่ออกไป

$$dS/dt = FS_r/V + FS/V - \mu X/Y_{X/S} - (1+\gamma)F_S/V \quad (2.40)$$

ที่สภาวะคงที่ (steady state) $dS/dt = 0$ และ $D = F/V$ เขียนสมการ (2.40) ได้ใหม่เป็น

$$X = D/\mu\, Y_{X/S}(S_r-S) \quad (2.41)$$

แทนค่า จากสมการ (2.39) จะได้ว่า

$$X = Y_{X/S}(S_r-S)/(1+\gamma-\gamma C') \quad (2.42)$$

จากสมการ(2.42) จะเห็นว่า X จะมีค่าสูงขึ้นเสมอ เมื่อมีการป้อนย้อนกลับ เนื่องจากถูกหารด้วยเทอม $(1+\gamma-\gamma C')$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 1 เสมอ

เมื่อแทนค่า μ จากสมการ (2.39) ลงในสมการ Monod จะได้ว่า

$$S = K_S\, /\mu_{max} - = K_S\, D(1+\gamma-\gamma C')/\mu_{max} - D(1+\gamma-\gamma C') \quad (2.43)$$

และเมื่อแทนค่าสมการ (2.43) ลงในสมการ (2.42) จะได้ว่า

$$X = Y_{X/S}/(1+\gamma-\gamma C')[S_r - Ks\, D(1+\gamma-\gamma C')/\mu_{max} - D(1+\gamma-\gamma C')] \quad (2.44)$$

สำหรับการหมักแบบต่อเนื่องหลายขั้นตอน โดยน้ำหมักที่ออกจากถังที่ 1 จะไหลเข้าสู่

ถังที่ 2 อย่างต่อเนื่องและถังหมักที่ 2 ยังอาจรับน้ำหมักใหม่ที่ป้อนเข้ามาทำให้ D มากกว่า μ_{max} ดังนั้นในแต่ละถังหมักจึงมีสารอาหารแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ถังหมักที่ 1 อาจเป็นถังที่จุลินทรีย์ใช้สารอาหารสำหรับผลิตเชื้อให้มีปริมาณมากที่สุด และถังหมักที่ 2 หรือถังหมักลำดับถัดมาก็ใช้เป็นที่เกิดของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังอาจนำเซลมาป้อนย้อนกลับเข้าสู่แต่ละถังได้ตามต้องการ

การทำสมดุลมวลสารของสารอาหารหรือของเซล สำหรับระบบหมัก 2 ขั้นตอนที่ไม่มีการนำเซลมาป้อนย้อนกลับและไม่มีน้ำหมักป้อนเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ตลอดเวลา สำหรับสมดุลของขั้นตอนที่ 1 จะเหมือนกับสมดุลของระบบหมักเคโมสแตทที่มีขั้นตอนเดียว ส่วนในขั้นตอนที่ 2 ทำสมดุลได้ดังนี้

สำหรับเซล

เซลสะสม = เซลเข้า − เซลออก + เซลที่เจริญ

$$dX_2/dt = FX/V_2 - FX_2/V_2 + \mu_2 X_2 \qquad (2.45)$$

ภายใต้สภาวะคงที่ (steady state) $dX_2/dt = 0$ และ $D_2 = F/V_2$ จะได้ว่า

$$\mu_2 = D_2 (1-X_2/X) \qquad (2.46)$$

สำหรับสารอาหาร

สารอาหารสะสม = สารอาหารเข้า − สารอาหารออก − สารอาหารที่ใช้

$$dS_2/dt = FS/V_2 - FS_2/V_2 - \mu_2 X_2/Y_{X/S} \qquad (2.47)$$

ที่สภาวะคงที่ (steady state) จะได้ว่า

$$X_2 = D_2/\mu_2 \, Y_{X/S}(\bar{S}-\bar{S}_2) \qquad (2.48)$$

จากสมการเหล่านี้จะเห็นว่า ถ้าไม่มีน้ำหมักป้อนเติมเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ค่า จะน้อยกว่า D และการเจริญในขั้นตอนที่ 2 จะมีค่าน้อย

การเติมน้ำหมักเติมเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 ทำให้ความหนาแน่นของเซลเติมขึ้นที่สภาวะคงที่ และอัตราการเจริญมีค่ามากกว่า μ_{max} ดังแสดงในสมการ (2.47) และ (2.48)

$$\mu = D_2 - F/V_2 \; X/X_2 \qquad (2.49)$$

$$X_2 = Y_{X/S}/\mu_2 \, (F/V_2\bar{S} + F'/V_2 \, S' - D_2\bar{S}_2 \qquad (2.50)$$

เมื่อ F' = อัตราการไหลของสารอาหารที่ป้อนเข้าสู่ถังหมักในขั้นตอนที่ 2, ลิตรต่อชั่วโมง

S' = ความเข้มข้นของสารอาหารในน้ำหมักที่ป้อนเข้าสู่ถังหมักในขั้นตอนที่ 2, กรัมต่อลิตร

2.9 การเปรียบเทียบความสามารถของการหมัก

2.9.1 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตระหว่างการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักแบบต่อเนื่อง (Batch productivity compared to continuous productivity)

ค่าความสามารถในการผลิต (productivity) จะแสดงในรูปของจำนวนกรัมของผลิตภัณฑ์ต่อลิตรต่อชั่วโมง (Aiba, 1973) ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 1 รอบ ใช้เวลาทั้งหมด ดังนี้

$$t_c = t_m + t_0 + t_1 + t_2$$

$$= t_m + t_\ell \qquad (2.51)$$

$$= 1/\mu_{max} \ln X_m/X_i + t_1 \qquad (2.52)$$

t_m = เวลาที่ใช้ในช่วง exponontial phase

t_0 = Harvest period

t_1 = เวลาที่ใช้ในการเตรียมระหว่างที่จะทำการหมักต่อไป

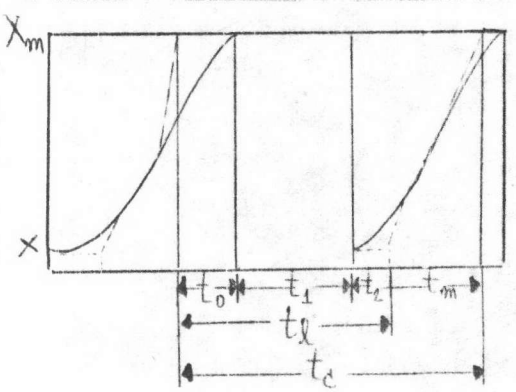
t_2 = เวลาที่ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม

$t_\ell = t_0 + t_1 + t_2$

X_i = น้ำหนักเซลเริ่มแรก (initial cell concentration)

X_m = น้ำหนักเซลสูงสุด (maximum cell concentration)

μ_{max} = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด เมื่อความเข้มข้นของสารไม่มีขอบเขตจำกัด



รูปที่ 2.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลกับเวลาที่ใช้ในการหมักไม่ต่อเนื่อง (Aiba, 1973)

จากสมการของปริมาณการเจริญเติบโต (yield of growth)

$$Y_{x/s} = -\Delta X/\Delta S \qquad (2.53)$$

$$Y_{x/s}\, S_0 = X_m - X_i \qquad (2.54)$$

ฉะนั้นอัตราการเกิดเซลในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (π_{batch}) หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง คือ

$$\pi_{batch} = \frac{Y_{x/s} S_0}{1/\mu_{max} \ln X_m/X_i + t_\ell} \qquad (2.55)$$

ส่วนอัตราการเกิดเซลในการหมักแบบต่อเนื่อง (π_{cont}) หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง คือ

$$\pi_{cont} = DX \qquad (2.56)$$

หรือ

$$(\pi_{cont})_{max} = D_m X_m \qquad (2.57)$$

โดย

$$D_m = \mu_{max}\left(1 - \frac{K_s}{K_s + S_0}\right) \qquad (2.58)$$

$$X_m = Y_{x/s}\{S_0 + K_s - K_s(S_0+K_s)\} \qquad (2.59)$$

เมื่อ

D_m = อัตราการเจือจางสูงสุด (maximum dilution rate) หน่วย ชั่วโมง$^{-1}$

K_s = ค่าคงที่ (saturated constant) หน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร

S_0 = ความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น (substrate concentration)

ฉะนั้น

$$(\pi_{cont})_{max} = \{\mu_{max}\left(1 - \frac{K_s}{K_s+S_0}\right) Y_{x/s}[S_0 + K_s - K_s(S_0+K_s)]\} \qquad (2.60)$$

$$= Y_{x/s}\,\mu_{max}\, S_0 \left(\frac{K_s + S_0}{S_0} - K_s/S_0\right)^2 \qquad (2.61)$$

เมื่อ $K_s << S_0$, สมการ(2.61)จะเหลือ

$$(\pi_{cont})_{max} = Y_{x/s}\,\mu_{max}\, S_0 \qquad (2.62)$$

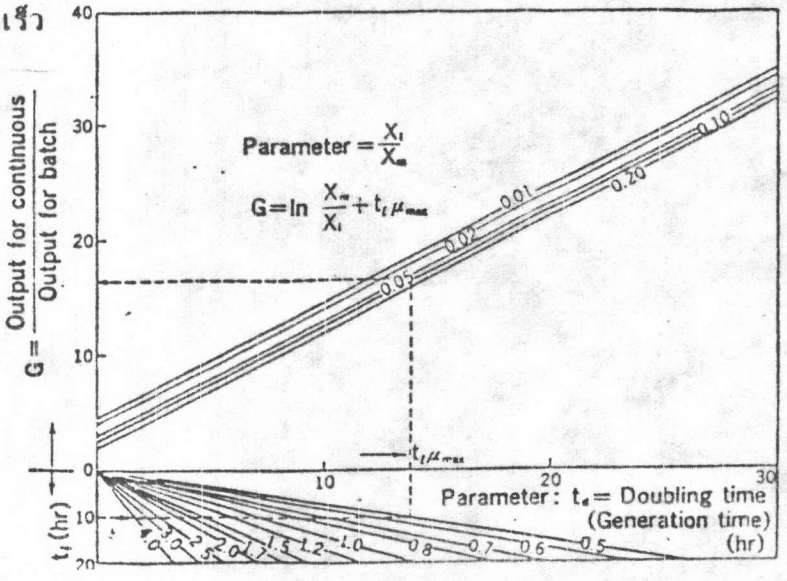
กำหนดให้

$$G = \frac{(P_{cont})_{max}}{P_{batch}} \quad (2.63)$$

$$= \frac{Y_{x/s}\mu_{max}S_0/Y_{x/s}S_0}{1/\mu_{max}\ \ln X_m/X_i + t_l} \quad (2.64)$$

$$\frac{(P_{cont})_{max}}{P_{batch}} = \ln X_m/X_i + t_l/\mu_{max} \quad (2.65)$$

จากสมการ (2.65) สามารถแสดงในกราฟรูป 2.7 โดยให้ปริมาณเซลที่เติมลงไป (inoculum size), 5% X_i/X_m = 0.05, t_l = 10 ชั่วโมง, doubling time (t_d) = 0.05 ชั่วโมง ซึ่งถ้าเปลี่ยนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องไปเป็นการหมักแบบต่อเนื่อง ค่า G จะมีค่าเท่ากับ 17 (หาได้จากกราฟรูป 2.7 โดยนำค่า t_l = 10 (แกน y ตอนล่าง) ลากเส้นแนวนอนมาตัดเส้น t_dที่ 0.05 แล้วลากเส้นตั้งฉากจากจุดตัดขึ้นไปตัดกับเส้น X_i/X_m = 0.05 แล้วลากเส้นขนานไปตัดแกน y (ตอนบน) ซึ่งเป็นค่า G จะได้ค่าประมาณ 17)นั่นคือค่า G จะได้รับอิทธิพลจากค่า t_d, t_l มากกว่าค่า X_i/X_m มาก แสดงให้เห็นว่า ปรากฏการณ์การหมักแบบต่อเนื่องจะให้ประโยชน์สำหรับเซลที่มีการเจริญเติบโตเร็ว



รูปที่ 2.7 การเปรียบเทียบการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักต่อเนื่อง (Aiba,1973)

ในทำนองเดียวกัน เมื่อแทนค่าพารามิเตอร์ $X_i/X_m = 0.05$, $t_f = 10$ ชั่วโมง ลงในสมการ (2.65) สามารถหาค่าของความสามารถในการผลิตระหว่างการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักต่อเนื่องที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่าง ๆ กัน (Wang, 1974) ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การเปรียบเทียบผลผลิตในการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักแบบต่อเนื่อง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในการหมักไม่ต่อเนื่อง (μ_{max}, ชม.$^{-1}$)	ผลผลิตของการหมักต่อเนื่อง (G) / ผลผลิตของการหมักไม่ต่อเนื่อง
0.05	3.5
0.10	4.0
0.20	5.0
0.40	7.0
0.80	11.0
1.0	13.0
1.2	15.0

จากตารางนี้พอสรุปได้ว่า การหมักแบบต่อเนื่องจะให้ผลผลิตดีกว่าการหมักไม่ต่อเนื่อง และจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตเร็วกว่า จะเหมาะกับการหมักแบบต่อเนื่องมากยิ่งขึ้น

2.9.2 <u>การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตระหว่างการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักกึ่งต่อเนื่อง</u> (Batch productivity compared to semi-continuous productivity)

อัตราการเกิดเซลในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (η_{semi}) หน่วยมิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรต่อชั่วโมง คือ

$$\eta_{semi} = 1/2 \{Y_{x/s} \mu_{max} S_0 + \frac{Y_{x/s} S_0 \mu_{max}}{\ln X_m/X_i + t_f \mu_{max}}\} \quad (2.66)$$

$$\eta_{semi} = 1/2\ Y_{x/s}\ max\ S_0 \{\frac{\ln X_m/X_i + t_f \mu_{max} + 1}{\ln X_m/X_i + t_f \mu_{max}}\} \quad (2.67)$$

กำหนด $Q = \mu_{semi} / \mu_{batch}$ (2.68)

$$\mu_{semi} = 1/2\ Y_{x/s}\ \mu_{max} S_0 \left\{ \frac{\ln X_m/X_i + t_l\ \mu_{max}}{\ln X_m/X_i + t_l\ \mu_{max}} + 1 \right\} \quad (2.69)$$

จากสมการ(2.55) $\mu_{batch} = Y_{x/s}\ S_0 / \left[1/\mu_{max} \ln X_m/X_i + t_l \right]$

$$Q = 1/2 \left\{ \ln X_m/X_i + t_l\ \mu_{max} + 1 \right\} \quad (2.70)$$

เมื่อแทนพารามิเตอร์ $\%X_i/X_m = 0.05$, $t_l = 10$ ชั่วโมง ลงในสมการ (2.70) สามารถหาค่าอัตราส่วนของความสามารถในการผลิตระหว่างการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักกึ่งต่อเนื่องที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่าง ๆ กันดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 การเปรียบเทียบผลผลิตในการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักกึ่งต่อเนื่อง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในการหมักเป็นครั้งคราว(μ_{max}, ชม.$^{-1}$)	ผลผลิตของการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Q) ผลผลิตของการหมักไม่ต่อเนื่อง
0.05	2.2
0.10	2.5
0.20	3.0
0.40	4.0
0.80	6.0
1.0	7.0
1.2	8.0

จากตารางจะเห็นว่าการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจะให้ผลดีกว่าการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและเมื่อเทียบกับตารางที่ 2.5 จะพบว่าการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจะให้ผลอยู่ระหว่างการหมักแบบต่อเนื่องกับการหมักไม่ต่อเนื่อง

2.10 การนำเซลยีสต์กลับมาใช้ใหม่

ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อการทดลองดำเนินมาเป็นระยะเวลานาน จนถึงช่วงเวลาหนึ่ง ที่คอลัมน์หมักตัวท้าย ๆ เซลยีสต์มีกิจกรรมในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นอาซาธานอลลดลง และมักจะจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนตกอยู่ก้นคอลัมน์ ซึ่งเซลพวกนี้เป็นเซลที่มีอายุมากและอ่อนแอ หรือบางตัวก็เป็นเซลที่ตายแล้ว ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอธานอลของระบบโดยรวมต่ำลง จึงได้หาวิธีมาปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยปรับสภาพเซลยีสต์ในน้ำหมักให้ active ขึ้น และนำกลับมาใช้ในการหมักใหม่

วิธีที่ช่วยในการกระตุ้นเซลยีสต์ที่อ่อนแอให้แข็งแรงขึ้น ได้แก่

1. ล้างด้วยกรด โดยนำตะกอนเซลยีสต์ (yeast slurry) ใส่ในกรดทาร์ทาริก กรดฟอสฟอริก หรือกรดซัลฟุริก เพื่อปรับ pH ให้อยู่ช่วง 2-3 เป็นการกระตุ้นเซลยีสต์ให้แข็งแรงขึ้น และเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ จากนั้นทิ้งไว้ 2-8 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใส่ในคอลัมน์ที่มีการให้อากาศ

แต่วิธีนี้มีข้อเสีย เนื่องจาก ค่า pH ต่ำมาก อาจทำให้การทำงานของยีสต์เปลี่ยนแปลงไปในระยะเริ่มทำการหมักใหม่ ๆ โดยยีสต์เหล่านี้จะผลิตกรดซัลไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ (Harrison ,1970)

2. การให้อากาศ ทำการให้อากาศในปริมาณเพียงเล็กน้อยตลอดเวลา คือประมาณ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (0.04-0.06 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) ก็จะช่วยกระตุ้นการทำงานของยีสต์ได้ โดยไม่มีผลกระทบต่ออัลกอฮอล์ในระบบ (Lyon ,1981) ส่วนงานวิจัยนี้ทำการทดลองการนำเซลยีสต์จากผลผลิตกลับมาใช้ใหม่โดยทำการดึงเซลเหล่านี้กลับมาที่คอลัมน์ที่มีการให้อากาศ และการเติมสารอาหารที่ใหม่ ๆ ตลอดเวลา ทำให้เซลมีการปรับตัวมาสู่สิ่งแวดล้อมที่ดีขึ้นมีอาหารอุดมสมบูรณ์และแข็งแรงขึ้น เมื่อปล่อยเซลที่แข็งแรงเหล่านี้มาสู่ระบบหมักโดยไหลมากับน้ำหมักตลอดเวลา จึงเป็นการเติมจำนวนเซลที่แข็งแรงแก่ระบบให้มีจำนวนมากขึ้นและสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอธานอลได้ดีขึ้นและเร็วขึ้นด้วย เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพแก่กระบวนการผลิตวิธีหนึ่ง

จากงานวิจัย (Cysewski และ Willike, 1977) เรื่องการดึงเซลกลับมาไว้ในกระบวนการหมักแบบเบื่องภายใต้ความดันบรรยากาศและภายใต้สภาวะสูญญากาศ ทำให้ได้เซลมีความหนาแน่นสูงขึ้น และอัตราการผลิตเอธานอลเร็วขึ้น เซลยีสต์ที่ใช้ได้

Saccharomyces cerevisiae (ATCC NO.4126) อุณหภูมิที่ใช้หมัก 35 องศาเซลเซียส อัตราการเติมสารอาหารกลูโคส 10% โดยน้ำหนักจำนวนเซลล์ที่ส่งกลับมาใช้ 50 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ภายใต้ความดันบรรยากาศจะผลิตเอธานอลได้ 29 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ส่วนเครื่องหมักแบบสูญญากาศจะสามารถลดการยับยั้งจากเอธานอลที่เกิดขึ้นได้ โดยดึงเอาไล่เอธานอลบางส่วนออกไปจากระบบ

การหมักภายใต้สภาวะสูญญากาศจะสมบูรณ์และเกิดอย่างรวดเร็ว เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูง ๆ ในการทดลองนี้ใช้อัตราการเติมกลูโคส 33.4 % โดยน้ำหนักกับระบบที่มีการดึงเซลกลับมาใช้ พบว่าจะผลิตเอธานอล 82 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และถ้าไม่มีการดึงเซลกลับมาไว้จะผลิตเอธานอล 40 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง สรุปได้ว่ากระบวนการหมักแบบต่อเนื่องทั้งสภาวะความดันบรรยากาศ และแบบสูญญากาศ เมื่อมีการดึงเซลกลับมาใช้จะผลิตเอธานอลได้สูงขึ้นกว่าเมื่อไม่มีการดึงเซลกลับมาใช้ จึงเป็นการสนับสนุนแนวความคิดที่ว่าการดึงเซลกลับมาไว้ในระบบเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตวิธีหนึ่ง