บทที่ 3

ทฤษฎี

3.1 การหมักแบบต่อเนื่อง

3.1.1 ลักษณะโดยทั่วไป

วิธีการหมักแบบต่อเนื่องเป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารเข้าสู่ถังหมักในระหว่างกระบวนการหมัก พร้อมกันนี้จะมีการดึงเอาของเหลวภายในถังหมักออกจากถังหมัก ที่อัตราการไหลเดียวกันกับอัตราการเติมสารอาหารเข้า ทำให้ปริมาตรของของเหลวภายในถังหมักคงที่ตลอดเวลา

การหมักแบบต่อเนื่อง แบ่งออกเป็น 2 ชนิด (ดังรูปที่ 3.1) คือ (Seragg, A. H., 1943)

1. Chemostat : ทำโดยการป้อนสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีการดึงเอาของเหลวภายในถังหมักออก ด้วยอัตราการไหลคงที่ ซึ่งมีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตปรับตัวเข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state)

2. Turbidostat : เป็นการควบคุมความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ให้คงที่ ด้วยเครื่องวัดความขุ่น ซึ่งจะติดตั้งไว้กับถังหมัก โดยจะป้อนสารอาหารในปริมาณเท่าใดก็ได้ตามต้องการเพื่อให้เซลล์มีความเข้มข้นที่คงที่ตลอดเวลา

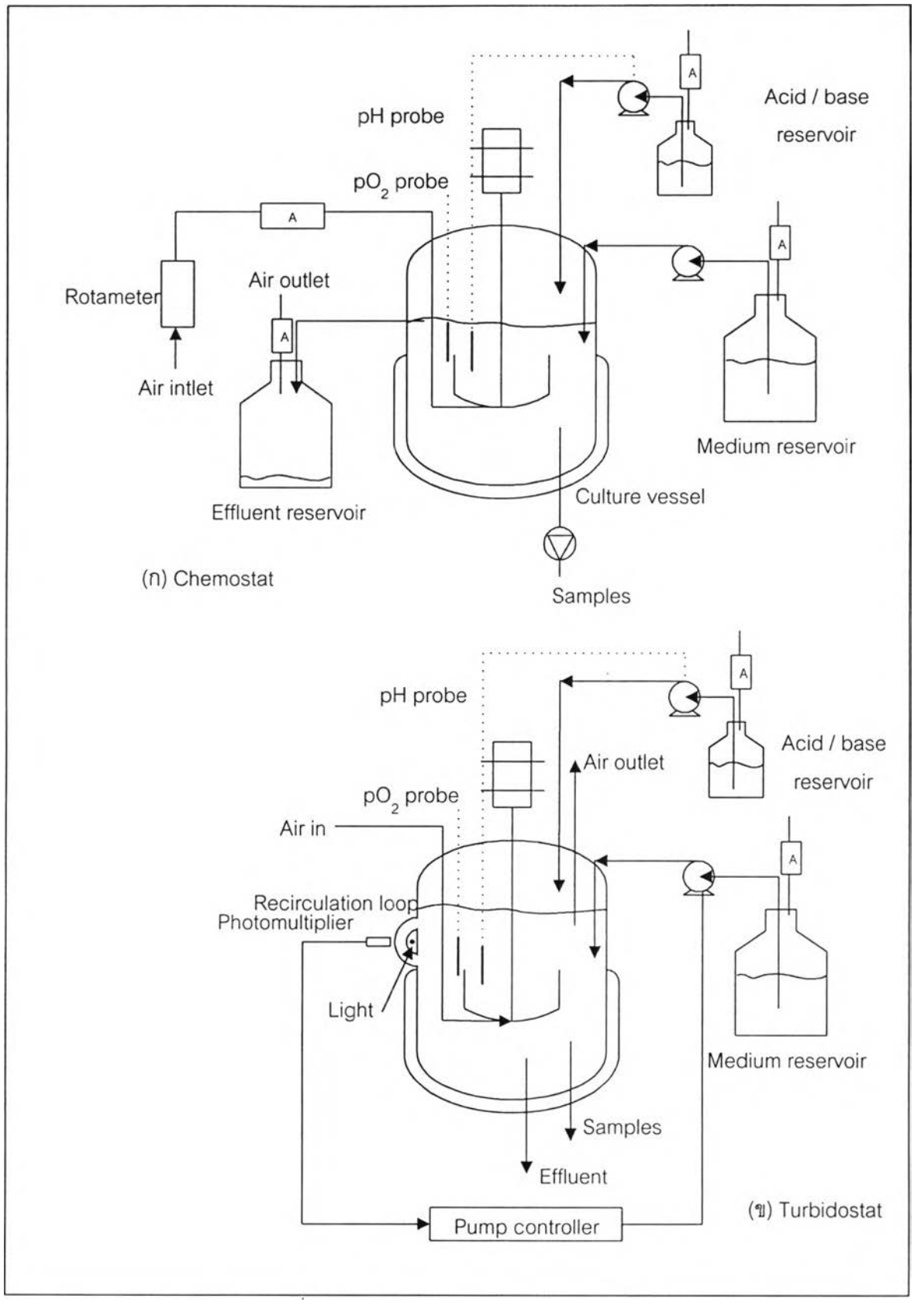
การหมักแบบต่อเนื่องมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่ต่อเนื่องดังนี้ คือ

1. อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สามารถควบคุมให้อยู่ในระดับที่ต้องการได้
2. สามารตรวจสอบผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีต่อการเจริญเติบโตและผลิตภัณฑ์เมื่ออัตราการเจริญเติบโตคงที่ได้

3. สามารถรักษาความเข้มข้นของเซลล์ให้คงที่ได้โดยการปรับอัตราการเจือจาง
4. การผลิตสาร secondary metabolite สามารถดำเนินไปได้พร้อมๆกับการเจริญเติบโต
5. สามารถหาค่าคงที่ทางจนศาสตร์ และค่าผลได้ของการเจริญเติบโตได้อย่างถูกต้อง
6. ให้อัตราผลผลิตต่อหน่วยปริมาตรสูง
7. มีประสิทธิภาพต่อหน่วยปริมาตรสูงกว่า และลดเวลาในช่วง Down time ซึ่งประกอบด้วย การทำความสะอาด การเตรียม และการฆ่าเชื้อสารอาหาร เป็นต้น การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องช่วยลดค่าใช้จ่ายได้เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้และลดแรงงานลงได้ ทำให้ค่าใช้จ่ายลดลง
8. สามารถรักษาภาวะคงที่สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อหลายชนิดผสมกัน (mix culture) ได้ ซึ่งการหมักแบบไม่ต่อเนื่องจะสามารถทำได้ชนิดเดียว
9. การเจริญเติบโตที่มีสารอาหารจำกัดสามารถทำได้ และสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเซลล์ และกิจกรรมทาง metabolite ได้โดยเปลี่ยนสารอาหารที่จำกัดต่อการเจริญเติบโต
10. ผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องจะน่าเชื่อถือและทำซ้ำได้

การหมักแบบต่อเนื่องมีข้อเสียเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่ต่อเนื่องดังนี้ คือ

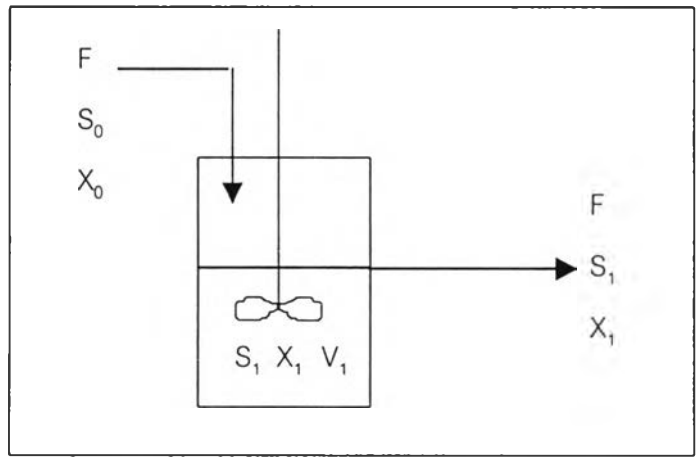
1. เกิดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผนังของถังหมัก และการสะสมของเชื้อจุลินทรีย์จะเป็นสาเหตุของการเกิดการ wash-out และป้องกันการเกิดภาวะคงที่ที่แท้จริง
2. การหมักแบบต่อเนื่องจะใช้เวลานานอาจเป็นผลให้สูญเสียสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ดั้งเดิม เนื่องจากมีเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่เจริญเติบโตได้เร็วกว่า



รูปที่ 3.1 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (ก) Chemostat (ข) Turbidostat (Seragg, A. H., 1943)

3. เชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยจะทำการหมักแบบต่อเนื่องได้ยาก เนื่องจากความหนืดและการผสมกันทำได้ยาก ทำให้เกิดการป้องกันภาวะคงที่ที่แท้จริง
4. การหมักที่ใช้เวลานานอาจเป็นผลให้เกิดการปนเปื้นของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ (contaminate)
5. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการหมักแบบต่อเนื่องต้องมีประสิทธิภาพสูง เพื่อป้องกันการชำรุดเนื่องจากต้องใช้เวลาการหมักนาน
6. การผลิตสารชนิด non-growth จะไม่ประสบความสำเร็จด้องอาศัยการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องช่วย

3.1.2 รูปแบบทางคณิตศาสตร์ของการหมักแบบต่อเนื่อง



รูปที่ 3.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

สมการสมดุลเชิงชีวมวล (biomass)

อัตราการสะสม = อัตราการเจริญ + อัตราการเข้า - อัตราการออก - อัตราการตาย

ของเซลล์ เติบโตของเซลล์ ของเซลล์ ของเซลล์ ของเซลล์

$$\frac{dX_1}{dt} = \mu_1 X_1 + \left(\frac{F}{V_1}\right)X_0 - \left(\frac{F}{V_1}\right)X_1 - \gamma_1 X_1 \qquad (3.1)$$

โดยมีสมมติฐาน

1. เซลล์อยู่ในระยะเจริญทวีคูณ ($\mu >> \gamma$)
2. ไม่มีเซลล์ในสารละลายเข้าถังหมัก ($X_0 = 0$)

กำหนดให้ $D_1 = F/V_1$ ดังนั้นที่ภาวะคงที่ (steady state) จะได้

$$\mu_1 = D_1 \qquad (3.2)$$

สมการสมดุลเชิงสารอาหาร (nutrient)

อัตราการสะสม = อัตราการเข้า - อัตราการออก - อัตราการใช้ - อัตราการใช้ - อัตราการใช้

ของสารอาหาร ของสารอาหาร ของสารอาหาร สารอาหาร สารอาหาร สารอาหารเพื่อ

เพื่อการเจริญ เพื่อยังชีพ ผลิตผลิตภัณฑ์

$$\frac{dS_1}{dt} = \left(\frac{F}{V_1}\right)S_0 - \left(\frac{F}{V_1}\right)S_1 - \frac{\mu_1 X_1}{Y_{x/s}} - mX_1 - \frac{\nu_1 X_1}{Y_{p/s}} \qquad (3.3)$$

โดยมีสมมติฐาน คือการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตมากกว่าการยังชีพ ($\frac{\mu_1 X_1}{Y_{x/s}} >> mX_1$)

ดังนั้นที่ภาวะคงที่จะได้

$$D(S_0 - S_1) = \frac{\mu_1 X_1}{Y_{x/s}} + \frac{\nu_1 X_1}{Y_{p/s}} \qquad (3.4)$$

สมการสมดุลเชิงผลิตภัณฑ์ (product)

อัตราการสะสม = อัตราการสร้าง + อัตราการเข้า - อัตราการออก - อัตราการสลายตัว

ของผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ ของผลิตภัณฑ์ ของผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์

$$\frac{dP_1}{dt} = \nu_1 X_1 + Y_{p/x}\left(\frac{F}{V_1}\right)X_0 - Y_{p/x}\left(\frac{F}{V_1}\right)X_1 - Y_{p/x}KX_1 \qquad (3.5)$$

โดยมีสมมติฐาน

1. ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ มีการสร้างผลิตภัณฑ์มากกว่าการย่อยสลายผลิตภัณฑ์
2. ไม่มีผลิตภัณฑ์ในสารละลายที่ป้อนเข้าถังหมัก

ดังนั้นที่ภาวะคงที่จะได้

$$\nu_1 = D_1 Y_{p/x} \qquad (3.6)$$

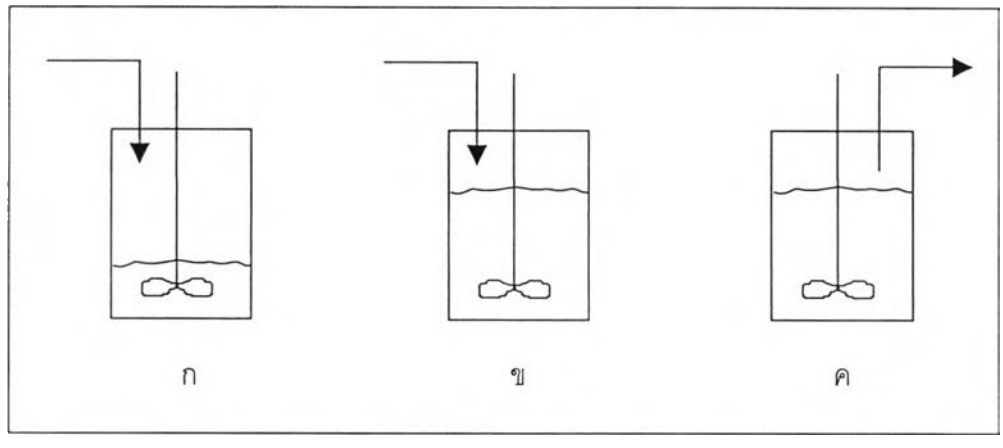
3.2 <u>การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง</u>

3.2.1 ลักษณะโดยทั่วไป

วิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารเข้าสู่ถังหมักในระหว่างกระบวนการหมัก แต่ไม่มีการดึงเอาของเหลวภายในถังหมักออกจากถังหมักจนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก ทำให้ปริมาตรของของเหลวในถังหมักเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (ดังรูปที่ 3.3) วิธีการหมักแบบนี้จะใช้ในกรณีต่างๆ ดังต่อไปนี้คือ

1. กรณีที่ความเข้มข้นของสารอาหารมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น การใช้เมทานอล หรือเอทานอล เป็นสารอาหาร จะพบว่าเมื่อใช้สารอาหารในปริมาณสูงจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์

เจริญเติบโตช้าลง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารดังกล่าวจึงจำเป็นต้องค่อยๆ ป้อนสารเข้าสู่ถังหมักอย่างช้าๆ เพื่อป้องกันมิให้มีการสะสมของปริมาณสารอาหารเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ยับยั้งการเจริญเติบโต



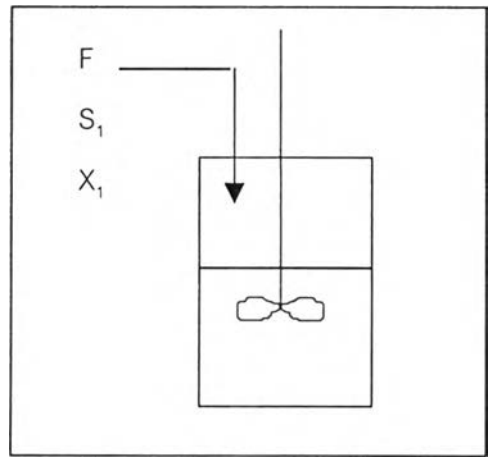
รูปที่ 3.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (ก) เริ่มต้นการหมัก (ข) ระหว่างการหมักจะมีการเติมสารอาหารตลอดเวลา ทำให้ปริมาตรเพิ่มขึ้น (ค) สิ้นสุดการหมัก (Michael, L. S.,1992)

2. กรณีที่เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาย่อยสลายสารอาหาร (catabolic repression) เนื่องมาจากมีการใช้สารอาหารที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่า เช่น มีกลูโคสอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง จะมีผลให้เกิดการหยุดการสร้างเอนไซม์หลายชนิดขึ้น

3. กรณีที่ต้องการลดความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งเกิดจากการผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น ในกระบวนการผลิต เดกซ์แทรน (dextran) หรือ แซนแทนกัม (xanthan gum) เป็นต้น

3.2.2 รูปแบบทางคณิตศาสตร์ของการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

กำหนดให้ถังหมักเป็นถังปฏิกิริยาแบบมีการผสมกันอย่างสมบูรณ์ และมีการป้อนน้ำหมักจากถังหมักแรกเข้าสู่ถังหมักที่สอง แต่ไม่มีการดึงน้ำหมักออกระหว่างการเพาะเลี้ยง และวัตถุประสงค์หลักของถังหมักนี้ คือต้องการให้จุลินทรีย์ผลิต PHB เพียงอย่างเดียว



สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.4 กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

สมการสมดุลเชิงชีวมวล (biomass)

อัตราการเปลี่ยนแปลง = อัตราการเจริญ + อัตราการเข้า - อัตราการออก - อัตราการตาย

ของเซลล์ เติบโตของเซลล์ ของเซลล์ ของเซลล์ ของเซลล์

$$\frac{d(V_2 X_2)}{dt} = \mu_2 V_2 X_2 + F X_1 - F_{out} X_2 - \gamma_2 X_2 \qquad (3.7)$$

โดยมีสมมติฐาน

1. อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์น้อยมากเนื่องจากวัตถุประสงค์ของถังหมักนี้คือ เพื่อให้เซลล์สร้างผลิตภัณฑ์เพียงอย่างเดียว

2. อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าอัตราการตายของเซลล์ ($\mu >> \gamma$)

3. ไม่มีการถ่ายของเหลวออกจากถักหมัก ($F_{out} = 0$)

จะได้

$$\frac{d(V_2 X_2)}{dt} = FX_1 \qquad (3.8)$$

สมการสมดุลเชิงสารอาหาร (nutrient)

อัตราการเปลี่ยนแปลง = อัตราการใช้ + อัตราการเข้า - อัตราการออก

ของสารอาหาร สารอาหาร ของสารอาหาร ของสารอาหาร

$$\frac{d(V_2 S_2)}{dt} = -\left[\frac{\mu_2 V_2 X_2}{Y_{x/s}} + mV_2 X_2 + \frac{\nu_2 X_2 V_2}{Y_{p/s}}\right] + FS_1 - F_{out} S_2 \qquad (3.9)$$

โดยมีสมมติฐาน

1. ไม่มีการถ่ายของเหลวออกจากถักหมัก ($F_{out} = 0$)

2. อัตราการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและเพื่อการยังชีพน้อยมากเมื่อเทียบกับอัตรา
การใช้สารอาหารเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์

จะได้

$$\frac{d(V_2 S_2)}{dt} = -\left[\frac{\nu_2 X_2 V_2}{Y_{p/s}}\right] + FS_1 \qquad (3.10)$$

สมการสมดุลเชิงผลิตภัณฑ์ (product)

อัตราการเปลี่ยนแปลง = อัตราการสร้าง + อัตราการเข้า - อัตราการออก - อัตราการสลายตัว

ของผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ ของผลิตภัณฑ์ ของผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์

$$\frac{d\left(P_2V_2\right)}{dt} = \nu_2 V_2 X_2 + Y_{p/x} F X_1 - Y_{p/x} F_{out} X_2 - Y_{p/x} \gamma_2 V_2 X_2 \qquad (3.11)$$

โดยมีสมมติฐาน

1. ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ มีการสร้างผลิตภัณฑ์มากกว่าการย่อยสลายผลิตภัณฑ์
2. อัตราการเข้าของผลิตภัณฑ์น้อยมากเมื่อเทียบกับอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์
3. ไม่มีการถ่ายของเหลวออกจากถังหมัก ($F_{out} = 0$)

จะได้

$$\frac{d\left(P_2V_2\right)}{dt} = \nu_2 V_2 X_2 \qquad (3.12)$$

สมการสมดุลเชิงปริมาตร (volume)

อัตราการเปลี่ยนแปลง = อัตราการเติม+ อัตราการเติม + อัตราการเติม - อัตราการระเหย

ปริมาตร สารอาหาร กรด-เบส antifoam ของน้ำหมัก

$$\frac{dV_2}{dt} = F + F_{acid-base} + F_{antifoam} - F_{evap} \qquad (3.13)$$

โดยมีสมมติฐาน

1. อัตราการเติม กรด-เบส, อัตราการเติม antifoam และอัตราการระเหยของน้ำหมักน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเติมสารอาหาร

จะได้

$$\frac{dV_2}{dt} = F \tag{3.14}$$

แทนค่าสมการที่ 3.14 ลงในสมการที่ 3.8, 3.10 และ 3.12 จะได้ว่า

$$\frac{dX_2}{dt} = \frac{F}{V_2}\left(X_1 - X_2\right) \tag{3.15}$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F}{V_2}\left[S_1 - S_2\right] - \left[\frac{\nu_2 X_2}{Y_{p/s}}\right] \tag{3.16}$$

$$\frac{dP_2}{dt} = \nu_2 X_2 - \left(\frac{F}{V_2}\right)P_2 \tag{3.17}$$