บทที่ 2

ทฤษฎีเบื้องต้น

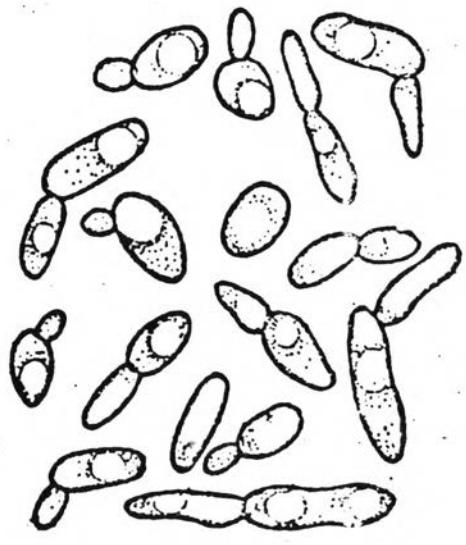
ในเรื่องทฤษฎีเบื้องต้นของขบวนการหมักนั้น ได้มีผู้เขียนเอาไว้ในตำราเกี่ยวกับทางด้านจุลชีววิทยาของอุตสาหกรรมการหมัก รวมทั้งเรื่องราวเกี่ยวกับขบวนการทางชีวเคมีของการเกิดแอลกอฮอล์ ซึ่งมีอยู่หลายเล่มด้วยกัน (ปรียา วิบูลย์เศรษฐ 2424, Rescott, Dunn, 1959; Rose, Harrison, 1969 และ Reed, Peppler,1973) อย่างไรก็ตามเพื่อให้การศึกษานี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นจึงขอกล่าวเกี่ยวกับจัจจัยต่าง ๆ ที่สำคัญในขบวนการผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งประกอบด้วย ยีสต์ อาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และการให้อากาศ องค์ประกอบทั้ง 5 นี้จะมีอิทธิพลซึ่งกันและกันไม่ทางตรงก็ทางอ้อม สำหรับการทำให้ขบวนการหมักมีประสิทธิภาพนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องจัดการหมักให้เหมาะสมแต่ละสภาพ ที่จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด โดยใช้ระยะเวลาน้อยที่สุด (ที่จะให้อัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อระยะเวลาหมักสูงสุด) และประหยัดที่สุด อีกทั้งให้ปริมาณแอลกอฮอล์อย่างสม่ำเสมอด้วย ซึ่งจะขอกล่าวถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้นพอสังเขปดังนี้

2.1 ปัจจัยที่สำคัญในขบวนการหมัก

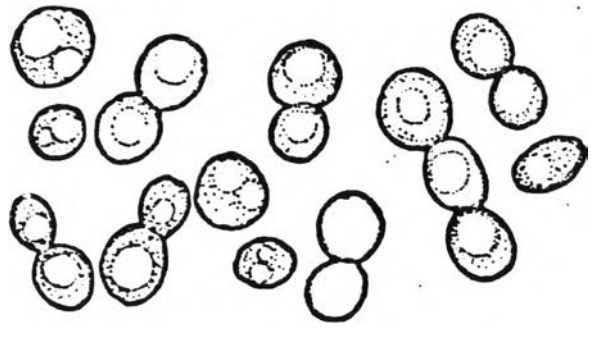
2.1.1 ยีสต์

ยีสต์ เป็นพวกราแท้ (true fungi) ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในชั้น แอสโคไมซีตีส (class Ascomycetes) ไม่มีคลอโรฟิลล์ มีนิวเคลียส เคลื่อนไหวไม่ได้ รูปร่างกลมรีหรือรูปไข่ มีขนาดใหญ่กว่าบัคเตรี คือ ยาวประมาณ 20 ไมครอน มียีสต์อีกหลายชนิดเหมือนกันที่มีรูปร่างลักษณะแตกต่างไปจากที่กล่าวแล้ว ตัวอย่างเช่น ยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมปัง ทำเบียร์ มีการสร้างแอสโคสสปอร์ เมื่อขยายพันธุ์ เป็นพวกเซลล์เดียว ส่วนมากขยายพันธุ์ได้โดยการแตกหน่อ (Budding) เซลล์ยีสต์ที่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะแตกหน่อเป็นสองเซลล์ได้ภายใน 1-2 ชั่วโมง ดังรูปที่ 2-1 แสดงถึงรูปร่างของเชื้อยีสต์ Saccharomyces cerevisiae โดยทั่วไปต้องการอุณหภูมิในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส อาจทนสภาพความเป็นกรดได้สูงที่มีความเป็น

รูปที่ 2-1



รูปร่าง Saccharomyces cerevisiae, CBS,1395
ภายหลังจากเลี้ยงในมอลต์แอกแทรกต์ 3 วัน



รูปร่าง Saccharomyces cerevisiae, CBS,1171
ภายหลังจากเลี้ยงในมอลต์แอกแทรกต์ 3 วัน

กรด-ด่าง 3.5 ยีสต์เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพมีอากาศและไม่มีอากาศ ซึ่งเป็นขบวนการทางชีวเคมีที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมัก ทั้งนี้ขบวนการหมักนั้นจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีการให้อากาศเต็มที่ และให้เกิดการย่อยสลายในสภาวะที่ปราศจากอากาศ ตัวอย่าง เช่น ยีสต์สำหรับทำขนมปัง (baker's yeast ส่วน Candida utilis (หรือ Torula) พบว่าดำรงชีวิตในสภาวะที่มีการให้อากาศมากกว่า Lodder จำแนกยีสต์ได้ 39 จีนัสและ 349 สปีชี่ ถึงแม้ว่าจะมียีสต์อยู่เพียงส่วนน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนบักเตรีที่มีทั้งหมด แต่พบว่ามีเพียง 2 จีนัส ที่มีบทบาทโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการหมักคือ Saccharomyces และ Candida (Prescott และ Dunn, 1959) ตัวอย่างเช่น Saccharomyces cerevisiae หรือเรียก distiller's yeast เหมาะในการใช้หมักแอลกอฮอล์ เชื้อนี้นอกจากจะเจริญเติบโตได้เร็วแล้ว ยังสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้มากอีกด้วย ยีสต์นี้สามารถหมักน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้เป็นเอทานอล (ตามทฤษฎีจะได้ 51% โดยน้ำหนัก) และคาร์บอนไดออกไซด์ (ตามทฤษฎีจะได้ 49% โดยน้ำหนัก) ในการทำเหล้าสาเก คือไวน์ญี่ปุ่นที่ทำจากข้าว ใช้ยีสต์หมักข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อรา ยีสต์ที่ใช้คือ Saccharomyces sake ซึ่งเป็นสายพันธุ์พิเศษของ Saccharomyces cerevisiae นั่นเอง และในขบวนการผลิตกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม Saccharomyces cerevisiae สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเฮกโซสประมาณ 10-24% ให้กลายเป็นกลีเซอรอลได้ โดยทั่วไปมียีสต์หมักได้แอลกอฮอล์ 12-14% แต่ในบางครั้งอาจได้แอลกอฮอล์สูงถึง 18-19% ทั้งนี้อยู่กับชนิดของยีสต์และสภาพแวดล้อมด้วย อย่างเช่น ใช้ Saccharomyces cerevisiae (เบเกอร์ คอมเพรสยีสต์) หมักจะได้แอลกอฮอล์ 15.1% แต่เมื่อใช้ Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus (Burgundy strain) จะได้แอลกอฮอล์ 18.4% โดยปริมาตร (Costor, 1954)

เซลล์ยีสต์มีส่วนประกอบดังนี้ ความชื้น 68-83% คาร์โบไฮเดรทอยู่ในรูปกลูแคน และแมนแนน ไนโตรเจนโดยเฉลี่ยประมาณ 7-9% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ โปรตีน (64-76% ของไนโตรเจนทั้งหมด) โดยปกติ โปรตีนจะเชื่อมต่อกับแมนแนน ฟิวรีนส์ ไพริมิดีนส์ กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น ไขมัน วิตามิน

และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ส่วนมากได้แก่ ฟอสเฟต

2.1.2 อาหาร

อาหารของยีสต์มีหลายชนิดด้วยกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ แต่อย่างไรก็ตาม พอที่จะแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

1. สารอาหารหลัก
2. สารอาหารเสริม
3. สารอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโต (growth factor)

หน้าที่ของอาหารที่มีต่อยีสต์ พอจะแยกได้ดังนี้คือ

ให้สารที่จำเป็นในการสร้าง โปรโตปลาสม (protoplasm)

ให้พลังงานซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์

เป็นตัวรับอีเล็คตรอน

แหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ คือ

2. 2.1.2.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนซึ่งเป็นสารอาหารหลักของยีสต์ ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานก็เป็นแหล่งคาร์บอนไปด้วย องค์ประกอบส่วนใหญ่ของเซลล์ของยีสต์เป็นสารประกอบ คาร์บอน เป็นต้นว่า คาร์โบรไฮเดรท กรดอะมิโน และสารประกอบอื่น ๆ เพราะฉะนั้นยีสต์จะต้องได้รับคาร์บอนอย่างเพียงพอในการดำรงชีพและขยายพันธุ์ ปกติแล้วยีสต์ได้คาร์บอนสำหรับใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์จากสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนโดยตรง คือ จะผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสารประกอบอินทรีย์ให้มีโมเลกุล เล็กลง เช่น กลูโคส จึงดูดเอากลูโคสเข้าไปใช้ในเซลล์อีกทีหนึ่ง เนื่องจากยีสต์มีผิวหน้ามาก ดังนั้นจึงสามารถดูดสารอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว อย่างเช่น ยีสต์ที่ใช้ในการทำเบียร์ 1 เซลล์สามารถเผาผลาญน้ำตาลมอลโตส 10^7 โมเลกุล ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และแอลกอฮอล์ได้ภายในเวลา 1 วินาที แต่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสได้ประมาณ 2×10^7 โมเลกุล ภายในเวลา

เพียงหนึ่งวินาทีเท่านั้น (ปรียา วิบูลย์เศรษฐ, 2524) แหล่งคาร์บอนที่ยีสต์สามารถย่อยและเปลี่ยนเป็นโปรโตปลาสมมีหลายพวก คือ น้ำตาลที่ประกอบด้วยคาร์บอนระหว่าง คาร์บอน 5 อะตอม ถึง คาร์บอน 6 อะตอม และ โปลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังมีกรดอินทรีย์ และสารประกอบอื่น ๆ เป็นต้นว่า ยีสต์ที่หมักโปลีแซคคาไรด์ เช่น อินูลินได้ดีคือ Saccharomyces fragilis ส่วน Endomycopsis fibuligera หมักแป้งได้ค่อนข้างดี (Reed และ Peppler,1973)

น้ำตาลที่ยีสต์หมักได้มี กลูโคส กาแลคโตส มอลโตส ซูโครส แลคโตส เทรฮาโลส เมลิไบโอส และราฟฟิโนส ถึงแม้ว่ายีสต์สามารถใช้เพนโตส หรือน้ำตาลที่ประกอบด้วย คาร์บอน 5 อะตอม ในการเจริญเติบโตได้ แต่ยังไม่เคยปรากฏว่ามียีสต์สามารถหมัก น้ำตาลเพนโตสได้ และยีสต์สามารถใช้เซลลิไบโอส ซึ่งเป็นน้ำตาล ไดแซคคาไรด์ ในการเจริญเติบโตได้ แต่เซลลิไบโอส ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการหมัก

2.1.2.2 แหล่งไนโตรเจน

ยีสต์สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปแบบง่าย ๆ สำหรับนำไปสร้างเอนไซม์ และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ได้ เช่น แอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียม และยูเรีย เป็นต้น ซึ่งเป็นทั้งอาหารหลักและอาหารเสริมของยีสต์ แต่บ่อยครั้งพบว่ายีสต์ต้องการสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนบางอย่าง เพราะมันไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง เช่น กรดอะมิโนบางตัว และสารพวกที่มีโครงสร้างหลักเป็น เพียวรีน และ ไพริมิดีนส์ ซึ่งสารพวกนี้อาจได้จากพวก yeast extract Thorne,Schultz และ Pomper (1948) พบว่า การเติมกรดอะมิโนลงในสารอาหารทำให้ เชื้อ Saccharomyces ทุกสปีชี่ เจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากยีสต์มีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนที่มีอยู่ในสารอนินทรีย์ ให้เป็นกรดอะมิโนและโปรตีนได้ โดยเฉพาะแอมโมเนียมไอออนที่ละลายอยู่ในน้ำจะถูกดูดนำไปใช้โดยยีสต์ได้ดีที่สุด แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญได้แก่ แอมโมเนียม ซัลเฟต ยีสต์ส่วนมากสามารถใช้แอมโมเนียม ซัลเฟตได้ (Wickerham, 1946) นอกจากนี้ยังมี แอมโมเนียมฟอสเฟต ไนเตรท และยูเรีย เป็นต้น ตัวอย่างเช่น เมื่อเติมไดแอมโมเนียม ฟอสเฟต ลงไปทำให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการทำงานของยีสต์ที่ใช้ทำขนมปังเพิ่มขึ้น (Pirschle,1930) Wickerham (1946) พบว่า Hansenula ทุกสปีชี่สามารถใช้ไนเตรทและไนไตรท์ได้ ส่วน Debaryomyces สามารถ

ใช้ได้เฉพาะไนเตรทเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้ไม่มีเอ็นไซม์ที่ใช้เปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนเตรท์เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้ไม่มีเอ็นไซม์ที่ใช้เปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ สำหรับ S.cerevisiae ไม่สามารถใช้ไนเตรทและไนไตรท์ แต่อย่างไรก็ตามถ้ามีไนไตรท์อยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงจะเป็นพิษมากทีเดียว

สำหรับยูเรียจะเป็นแหล่งที่ให้ไนโตรเจนที่ดีพอ ๆ กับ แอมโมเนียม ซัลเฟต (Schultz, 1940) ซึ่งยูเรียจะสลายตัวต่อไปอย่างรวดเร็วและเกิดขึ้นได้แทบทุกสภาพ (ยกเว้นสภาพที่ปราศจากอากาศ ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง เพราะว่าขณะเกิด แอมโมเนียและไนโตรเจนถูกใช้ไป จะทำให้ความเป็นกรด-ด่าง ในสารอาหารจะเปลี่ยนเป็นกรดมาก) นอกจากนี้ผลพลอยได้ที่ได้จากโรงเบียร์คือ บอททอมยีสต์ (bottom yeast) และทอปยีสต์ (top yeast) ยังใช้เป็นแหล่งเสริมโปรตีนและกรดอะมิโน (Thorne,1933 และ 1941)

ในการดูดไนโตรเจนไปใช้โดยยีสต์นั้น มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการนำคาร์บอนไปใช้ นั่นคือ ความต้องการคาร์บอนและไนโตรเจนของเซลล์เพื่อนำไปสร้างเซลล์ใหม่ เป็นความต้องการที่มีสัดส่วนค่อนข้างแน่นอน เช่น อัตราส่วนของน้ำตาลต่อไนโตรเจน ควรจะเป็น 17.5 : 1 ของ wort ทั้งหมดที่ใช้ (wort เป็นสารละลายใสที่ได้จากแมสซิ่ง) (Howells, 1929)

2.1.2.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเจริญเติบโตของยีสต์ นอกเหนือไปจากไนโตรเจน ซึ่งเป็นอาหารเสริม โดยมากเติมลงไปในรูปของเกลือฟอสเฟต เช่น แอมโมเนียม ฟอสเฟต โปตัสเซียมฟอสเฟต เมื่อใช้ในการกระตุ้นให้ยีสต์บางชนิดเจริญเติบโตได้ เนื่องจากฟอสฟอรัสมีความจำเป็นสำหรับการให้สารประกอบที่มีพลังงาน นั่นคือ ATP ตัวอย่างเช่น ทอปยีสต์เจริญเติบโตได้เร็วมาก เมื่อมีฟอสเฟตในปริมาณเพียงพอในสารอาหาร (Markham และ Byrne, 1967)

2.1.2.4 แหล่งแร่ธาตุและวิตามินอื่น ๆ

แร่ธาตุของยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับความจำเป็นที่จะนำไปสร้างสารประกอบอินทรีย์ที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์ แร่ธาตุบางชนิดมีได้เป็นองค์

ประกอบของสารอินทรีย์ใด ๆ เลย แต่มีหน้าที่ช่วยหรือกระตุ้นให้ปฏิกริยาหรือขบวนการสำคัญต่าง ๆ ในเซลล์เป็นไปได้ด้วยดี ปกติแล้วยีสต์ต้องการ growth factor ในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น กำมะถันเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน ซีสเตอีน (cysteine) และซีสไตน์ (cystine) พวก เมทไทโอนีน (methionine) (Maw, 1965) หน้าที่ของแมกเนเซียม ซึ่งเติมในรูป แมกเนเซียม ซัลเฟต ช่วยกระตุ้นปฏิกริยาต่าง ๆ และเป็นส่วนประกอบอยู่ในกรดไธโมนิวคลีอิก ดังนั้น แมกเนเซียม จัดว่าจำเป็นมากที่จะต้องมีอยู่ในสารอาหาร (Fumer et al, 1921, 1936 และ Morris, 1958) ยีสต์ยังต้องการโปตัสเซียมสำหรับการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะขณะที่มีการใช้คาร์บอน (Atkin et al, 1949)

สำหรับวิตามินนั้นซึ่งเป็นสารอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโต (growth factor) ยีสต์แต่ละชนิดมีความต้องการวิตามินแตกต่างกัน และวิตามินบางอย่างยีสต์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ เช่น วิตามิน บี ไบโอติน เป็นต้น ดังนั้นหากต้องการให้ยีสต์เจริญไปได้ด้วยดี เมื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพแล้ว จะต้องเติมลงไปในสารอาหารเท่าที่จำเป็น ในการทดลองของ Suomalainen และ Keranen (1963), Wain wright (1971) ได้ใช้วิตามินโดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่ไม่มีวิตามินรวมอยู่ กับเลี้ยงในอาหารที่เติมวิตามินแต่ละชนิดลงไป มีรายงานว่า ยีสต์ส่วนมากต้องการไบโอตินในการเจริญเติบโต และมียีสต์เพียงบางชนิดเท่านั้นที่ต้องการไรโบเฟลวิน ยีสต์บางชนิดถ้าไม่มีวิตามินที่ต้องการแล้ว ไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตได้เลย Klocckera และ Hanseniaspora ต้องการกรดแพนโทธินิก และอินโนซิทอล ส่วน Saccharomyces fragilis ต้องการกรดไนอะซีน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต แหล่งวิตามินที่สำคัญ เช่น ยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง ทำเบียร์ Saccharomyces cerevisiae และ Candida utilis

2.1.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ รวมทั้งจลน์ศาสตร์ของขบวนการหมักด้วย ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์จะสูงขึ้นตามอุณหภูมิ จนถึงจุดหนึ่งจะลดลง และในที่

สูงถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปยีสต์จะตาย ดังนั้นในขบวนการหมักจึงจำเป็นต้องปรับสภาวะให้ได้ตามความสามารถเฉพาะแต่ละชนิดของยีสต์ ซึ่งจะทำให้ยีสต์นั้นเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ตัวอย่างในการทดลอง Kurth (1946), Jones และ Hough (1970) พบว่า การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะมีผลต่ออัตราการใช้น้ำตาล ซึ่งปริมาณการใช้น้ำตาลจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ปกติแล้วยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ที่มีอุณหภูมิช่วงกว้างมาก ยีสต์เจริญได้ช้ามากที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่านี้เพียงเล็กน้อย อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหมาะสมในการขยายพันธุ์ คือ 25-35 องศาเซลเซียส ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ทำลายยีสต์ได้ภายใน 30 นาที สปอร์ของยีสต์ทนความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ยีสต์ Linger et al (1942) แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ 28.3 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ distiller's yeast, Inskeep et al (1915) รายงานว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้ผลการผลิตโปรตีนจากอาหารเหลวซัลไฟท์ดีที่สุด สำหรับ Reiser (1954) กล่าวว่า อุณหภูมิที่ดีที่สุดและยีสต์ชอบมากที่สุดคือ อุณหภูมิในช่วง 30-32 องศาเซลเซียส อย่างเช่นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับหมักไวน์แดงจะต่ำกว่า 21 องศาเซลเซียส ถ้าหากอุณหภูมิสูงกว่า 37.8 องศาเซลเซียสแล้ว ยีสต์จะเจริญเติบโตช้าลง และการเกิดแอลกอฮอล์จะลดน้อยลงด้วย (Ough, 1966) ดังนั้น การควบคุมอุณหภูมิจึงมีความจำเป็น เพราะอุณหภูมิของบรรยากาศรอบ ๆ เครื่องหมักอาจสูงหรือต่ำเกินไปกว่าระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของยีสต์ในขบวนการหมักนั้น และในขณะที่ยีสต์เจริญในระหว่างการหมักก็จะเกิดพลังงานความร้อนเนื่องจากปฏิกริยาชีวเคมีในการออกซิไดส์สารอาหาร ปกติจะทำการควบคุมอุณหภูมิโดยอัตโนมัติ

2.1.4 ความเป็นกรด-ด่าง

การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างของขบวนการหมักจะมีผลต่อเมตาโบลิซึมของยีสต์ อาจทำให้การเจริญชะงัก ซึ่งจะขึ้นกับวัตถุดิบที่ใช้เป็นสูตรสารอาหาร และสภาพแวดล้อมในการหมัก โดยการใช้สารบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมหรือเติมกรดหรือด่าง ในปริมาณพอเหมาะระหว่างการหมัก จะช่วยในการควบคุมความเป็นกรด-ด่างไว้ได้เป็นอย่างดี นอกจากจะทำให้การเจริญได้ดีแล้ว ยังอาจช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้อีก ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์จะขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้

ในสารอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่างช่วงกว้างมาก มียีสต์บางชนิดเท่านั้นที่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 3 ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ ความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 4.5-6.5 แต่อย่างไรก็ตามยีสต์ยังสามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7-8 Peterson et al (1951) รายงานว่า ยีสต์เจริญได้ดีในสารอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่าง 4.5-5.5 โดยเฉพาะที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.6 ยีสต์เจริญได้ดีที่สุด (Agarwal et al,1947) สำหรับ Malee (1972) พบว่า เมื่อจัดสภาพความเป็นกรด-ด่าง 4-4.5 แต่ Torula utilis ทำให้ปราศจากการปนเปื้อนจากบักเตรี ดังนั้น ในการควบคุมความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักปกติแล้วจะพยายามจัดสูตรสารอาหารของน้ำหมักให้มีความเป็นบัฟเฟอร์ ให้ได้ความเป็นกรด-ด่างตามต้องการในระหว่างการหมัก และให้ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักมีค่าอยู่ในช่วงแคบ ๆ เพื่อให้การผลิตมีประสิทธิภาพ

2.1.5 การให้อากาศ

ยีสต์ต้องการออกซิเจนจากอากาศเพื่อใช้ในการหายใจ ซึ่งอยู่ในรูปของอากาศที่ป้อนเข้าไปในขบวนการหมัก การให้อากาศในเครื่องหมักมีความจำเป็นและสำคัญสำหรับการหมักแบบใต้พื้นผิวของจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน เพราะถ้าอาศัยออกซิเจนจากอากาศที่ละลายในน้ำหรือน้ำหมัก โดยธรรมชาติแล้วจะมีน้อยมาก และมีเฉพาะบริเวณที่ใกล้ ๆ กับพื้นผิวสัมผัสของอากาศกับของเหลวเท่านั้น ส่วนใต้ผิวของน้ำหมักลึกลงไปจะไม่มีออกซิเจนอยู่เลยสำหรับให้จุลินทรีย์ การให้อากาศจึงมีจุดประสงค์หลักเพื่อให้ออกซิเจนเพียงพอกับความต้องการของจุลินทรีย์ไม่ให้เป็นตัวจำกัดในการเจริญหรือการทำงานของเซลล์ และผลที่ตามมาการให้อากาศยังช่วยกวนให้น้ำหมักจุลินทรีย์ และอากาศเองผสมผสานเข้ากันดี เครื่องหมักแบบคอลัมน์เป็นวิวัฒนาการต่อจากถังกวน จะไม่มีเครื่องช่วยกวน แต่การกวนเกิดจากการให้อากาศที่เป็นฟองเล็ก ๆ

อากาศที่ใช้จะได้จากเครื่องอัดอากาศ อัดผ่านเครื่องกรองให้อากาศปลอดเชื้อก่อนการฉีดเข้าสู่ถังหมักผ่านหัวฉีดซึ่งพ่นอากาศออกมาในรูปของฟองอากาศขนาดเล็ก ๆ จากก้นถังหมัก จากการศึกษาหัวกระจายอากาศในการผลิตแอลกอฮอล์ในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ของ นิคม ติปะวาโร, 2523 พบว่า หัวกระจายแบบตะแกรงโลหะหรือแผ่นโลหะเจาะรูเป็นแบบที่เหมาะสมสำหรับเครื่องหมักแบบคอลัมน์ ในการผลิตแอลกอฮอล์ โดยให้อากาศในอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตร

น้ำหมัก ต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สำหรับการขยายเซลล์ของยีสต์ที่เหมาะสม แต่ไม่ต้องการอากาศสำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมัก อย่างไรก็ตามการให้อากาศในอัตราสูง เกินไปจะมีผลทำให้อัตราการผลิตลดลง และอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์จะเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การให้อากาศยังเป็นปัจจัยอันหนึ่งที่สำคัญมากในการพิจารณาออกแบบเครื่องหมักสำหรับขยายขนาดการหมัก สำหรับการให้อากาศกับเครื่องหมักแบบคอลัมน์ของเหลวที่ใช้เป็นน้ำ ขนาดของฟองอากาศอยู่ระหว่าง 0.5-2.0 มิลลิเมตร ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก อย่างเช่นความเข้มข้นของออกซิเจนในที่นี้คือ ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก ค่าความเข้มข้นวิกฤตของออกซิเจน สำหรับ C.utilis ในเกลืออะซีเตทมีค่า 1.3×10^{-6} โมล่าร์ (Johnson, 1967) และสำหรับ S. cerevisiae มีค่า 2.84×10^{-6} โมล่าร์ ที่ 30 องศาเซลเซียส (Kingler, 1941) ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักนี้จะมีค่าแตกต่างกันขึ้นกับยีสต์ที่ใช้สภาวะการเจริญเติบโต และการหมัก ดังนั้นในการจัดระบบการให้อากาศให้เหมาะสมที่สุดนี้จึงนับว่าเป็นสิ่งสำคัญต่อขบวนการหมัก

2.2 กลไกในขบวนการหมัก

เนื่องจากไม่ได้เน้นทางด้านชีวเคมีของการหมัก จึงขอกล่าวพอสังเขปดังนี้ ส่วนรายละเอียดดูได้จากภาคผนวก ข

ยีสต์เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการหมักโดยเฉพาะขบวนการหมักที่มีแอลกอฮอล์เกิดขึ้นตามสมการ

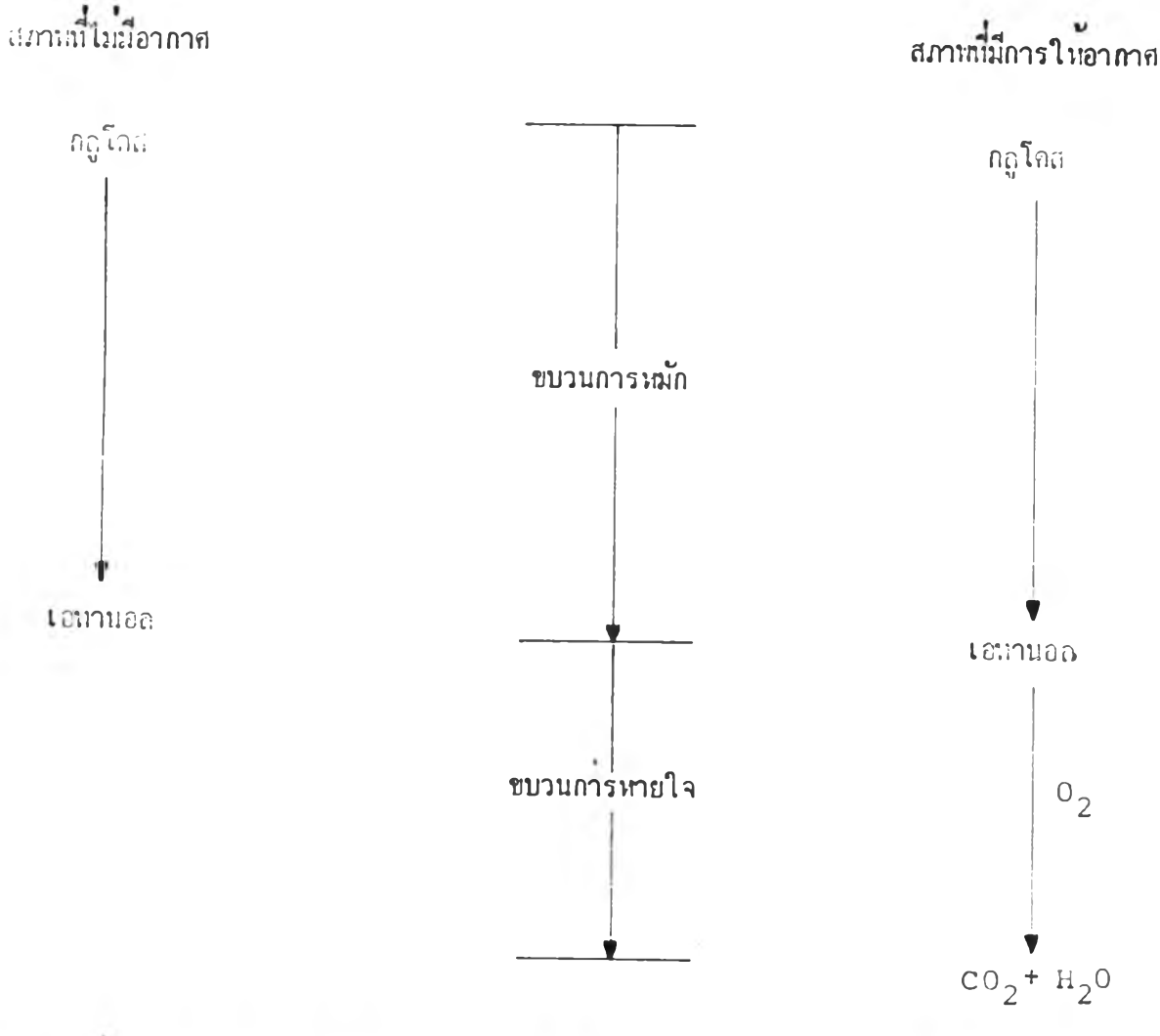
$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \quad \Delta G = -56 \text{ กิโลคาลอรี่}$$

กลูโคส เอทานอล

Saccharomyces cerevisiae นอกจากจะมีคุณสมบัติในการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแล้ว ยีสต์ยังมีเมตาบอลิสมการหายใจอีกด้วย คือในสภาพที่มีออกซิเจนสามารถออกซิไดส์กลูโคส ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \qquad \Delta G = -688 \text{ กิโลคาลอรี่}$$

ปฏิกริยาต่าง ๆ ของยีสต์ที่เกิดขึ้นในเซลล์ ขึ้นอยู่กับสภาวะในการเจริญเติบโต ยีสต์สามารถเปลี่ยนจากขบวนการหมักเป็นขบวนการหายใจให้พลังงานมากกว่าขบวนการหมักดังรูปที่ 2-2



รูปที่ 2-2 เปรียบเทียบการย่อยสลายในสภาพที่ไม่มีอากาศและในสภาพที่มีการให้อากาศโดยยีสต์ (ดูใน Lehninger, 1975)

ในสภาพที่ไม่มีอากาศ น้ำตาลกลูโคสผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ด้วยระบบขนส่งที่ผนังเซลล์ และการหมักเกิดในไซโตปลาสม กลูโคสจะเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคลิซิส Glycolysis หรือ Embden - Meyerhof pathway, EMP) รายละเอียดดูได้ในภาคผนวก ข เมื่ออาหารขาดแหล่งไนโตรเจนและยีสต์ไม่เจริญเติบโต ยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนกลูโคสบางส่วนเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ S. cerevisiae ในระยะหมักตัว และมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาล 70% ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ ส่วนน้ำตาลที่เหลืออีก 30% ยีสต์เก็บสะสมไว้

ผลผลอยได้จากการหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ได้ประมาณร้อยละ 95 และยีสต์ยังสร้างสารอื่น ๆ ได้อีกด้วย เช่น กลีเซอรอล กรดซัคซินิค แอลกอฮอล์โมเลกุลโต กรดซิตริก และกรดแลคติก เป็นต้น

ส่วนในสภาพที่มีการให้อากาศ ผลที่ได้ในขั้นสุดท้ายจากวัฏจักร EMP ก็จะเข้าสู่วัฏจักร กรบส์ (Krebs cycle) จากนั้นจะถูกออกซิไดส์ โดยการผ่านอีเล็คตรอนเข้าไปในลูกโซ่การหายใจหรือลูกโซ่การขนส่งอีเล็กตรอน รายละเอียดดูในภาคผนวก ข

ผลผลอยได้ภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนจะแตกต่างกันตามชนิดของยีสต์ เช่น ในการผลิตเอทานอล ของเชื้อ S. ellipsoideus การให้อากาศในช่วงแรกของการหมดลอง เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ยีสต์ให้มากสำหรับการหมักแบบไม่ให้อากาศ และในเอทานอลออกมามากสุดจากหยุดการให้อากาศกับเชื้อหมัก

2.3 เครื่องหมัก

เครื่องหมักเป็นภาชนะหรือถังปฏิกริยาที่สามารถจัดการหรือควบคุมสภาวะทางด้านอาหารและสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตที่ดี หรือให้ผลผลิตตามต้องการของจุลินทรีย์ (Tannanbaum และ Wang, 1975) เครื่องหมักจะต้องมีลักษณะเฉพาะสมสามารถทำให้ปลอดเชื้อได้ และควบคุมสภาวะแวดล้อมตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่าง ๆ ได้เช่น อัตราการกวน ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ ความเข้มข้นของสารอาหาร ตลอดจนการชักตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์และการถ่ายเทน้ำหมักจากถังหมักถังหนึ่งไปสู่อีกถังหนึ่งภายใต้

สภาพที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนได้ (Solomon, 1969) ซึ่งในการปรับปรุงและเทคนิคในขบวนการผลิต เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นจะมุ่งไปที่เครื่องหมัก เพื่อให้เกิดความเข้าใจในเรื่องเครื่องหมักจะขอกล่าวถึงชนิดของเครื่องหมักพอสังเขปดังนี้

เครื่องหมักแบ่งเป็นชนิดใหญ่ ๆ ตามลักษณะการให้อากาศและการกวนได้ 3 ชนิด ด้วยกัน คือ ชนิดถังกวน คอลัมน์ และแบบผสมระหว่างถังกวนและคอลัมน์

3.2.1 เครื่องหมักชนิดถังกวน

ถังกวนเป็นเครื่องหมักชนิดที่นิยมใช้กัน เป็นชนิดทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาทดลองในโรงงานต้นแบบและในวงการอุตสาหกรรมการหมัก ลักษณะเป็นภาชนะตรงกระบอกตั้งตรงในแนวดิ่ง ตัวถังอาจเป็นพลาสติก แก้ว และโลหะ แล้วแต่จุดประสงค์ของการออกแบบในงาน ตามโรงงานอุตสาหกรรมหมักเชื้อมักใช้โลหะเป็นเหล็กปราศจากสนิม เพราะมีความคงทนแข็งแรง ส่วนในงานศึกษาทดลองนั้นอาจใช้แก้ว เนื่องจากหาง่าย สะดวก ทำให้เห็นลักษณะของการหมัก ถังกวนโดยทั่ว ๆ ไปจะมีส่วนประกอบตามแบบ Finn (1954) และถังหมักแบบถังกวนนี้เป็นไปไม่ได้ที่จะให้อากาศกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของน้ำหมักโดยปราศจากการกวน และการเติบโตของเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยการให้อากาศ ถ้าประสิทธิภาพในการกวนและการให้อากาศดี จะทำให้มีการใช้น้ำตาลมากขึ้น (Johnson; olson, 1949; Reiser, 1954 และ Bunker, 1963) และผลผลิตยีสต์เพิ่มขึ้น (Vananuoat, Kinsella, 1975) ด้วยเหตุนี้จึงกล่าวได้ว่า ในการหมักจะต้องมีควบคุมทั้งอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนคู่กันไป ทำให้ต้องใช้พลังงานมากในการใช้มอเตอร์เพื่อหมุนใบกวน ซึ่งไม่สอดคล้องกับยุคที่เริ่มมีปัญหาทางด้านพลังงานโดยเฉพาะปัจจุบันนี้ และยังเพิ่มภาระในการควบคุมมากขึ้น ซึ่งเป็นข้อเสียของถังกวน นอกจากนี้การใช้มอเตอร์ยังทำให้ยุ่งยากในการติดตั้ง เพื่อให้ถังหมักปราศจากเชื้อแปลกปลอมจากภายนอก ตลอดเวลาการหมักซึ่งใช้เวลานานและยังเพิ่มภาระในการบำรุงรักษาและซ่อมแซมด้วย ถึงแม้ว่าถังหมักแบบถังกวนนี้จะมีประสิทธิภาพในการถ่ายเทออกซิเจนสู่น้ำหมักดีก็ตาม

3.2.2 เครื่องหมักชนิดหอสูง

เครื่องหมักชนิดหอสูง อาจจะเรียกว่าถังลึก คอลัมน์ หรือคอลัมน์ฟองอากาศ

ก็ได้ โดยอาศัยความรู้และเทคโนโลยีทางด้าน จุลชีว ชีวเคมี และหน่วยปฏิกริยา ทำให้การพัฒนาหน่วยปฏิกริยาเคมีให้เป็นถังหมักแบบหอสูงขึ้น ลักษณะโดยทั่วไปเป็นทรงกระบอก มีความสูงมากกว่าความกว้าง ตั้งในแนวดิ่ง ไม่มีเครื่องกวน การผสมภายในเครื่องหมักจะขึ้นกับระบบการให้อากาศ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่ต่างจากถังกวน ซึ่งการให้อากาศจะขึ้นกับตัวกระจายอากาศ จะอยู่ที่ฐานล่างของคอลัมน์ อากาศจากเครื่องอัดอากาศผ่านเข้าสู่เครื่องกรองหรือเครื่องฆ่าเชื้อ เครื่องวัดอัตราการให้อากาศ ตัวกระจายอากาศและเข้าสู่น้ำหมักตามลำดับ ขณะที่ฟองอากาศเคลื่อนขึ้นน้ำหมักส่วนที่อยู่ใกล้ฟองอากาศจะเคลื่อนขึ้นไปด้วย ขณะที่น้ำหมักรอบนอกออกไปเคลื่อนลง ทำให้มีการผสมผสานกันขึ้น (Jackson, shen, 1978)

เครื่องหมักแบบหอสูงสร้างได้ง่าย ราคาถูก ใช้พลังงานน้อย การควบคุมไม่มาก เนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องช่วยกวน ประสิทธิภาพในการถ่ายเทออกซิเจนสู่น้ำหมักเป็นสัดส่วนโดยตรงกับอัตราการให้อากาศ ความสูงของน้ำหมัก ความหนาแน่นของน้ำหมัก และเป็นสัดส่วนกลับกับขนาดของฟองอากาศ ปริมาตรของน้ำหมัก และความหนืดของน้ำหมัก ดังนั้นถ้าน้ำหมักมีความลึกมาก ทำให้น้ำหมักส่วนบนและล่างมีความเข้มข้นแตกต่างกันได้ ปริมาณออกซิเจนในฟองอากาศจะมากตรงส่วนล่าง แล้วค่อย ๆ ลดตามความสูงของคอลัมน์ จึงทำให้เซลล์ที่อยู่ส่วนล่างใกล้กับระบบการให้อากาศจะรับออกซิเจนได้มากกว่าเซลล์ที่อยู่สูงขึ้นไป (Jackson, shen,1978) เมื่อเป็นเช่นนี้ Lefrancois (1955) เป็นคนแรกที่ได้ออกแบบปรับปรุงเครื่องหมักแบบหอสูงให้ดีขึ้น เรียกว่าเครื่องหมักแบบแอร์ลิฟท์ และต่อมาก็มีเครื่องหมักแอร์ลิฟท์แบบใหม่ (อำนวย สุขเหมือน, 2521) ซึ่งให้ผลดีเป็นที่น่าพอใจในการผลิตยีสต์ C. utilis จากน้ำดับปรด เมื่อเทียบกับการใช้เครื่องหมักถังกวน และได้ทำการศึกษาเครื่องหมักแบบคอลัมน์นี้ไปใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ โดยศึกษาหัวกระจายอากาศแบบต่าง ๆ กัน พบว่า หัวกระจายอากาศแบบตะแกรงโลหะและแบบแผ่นโลหะเจาะรู เป็นแบบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเครื่องหมักแบบคอลัมน์ (นิคม ติปะวาโร, 2523)

เครื่องหมักแอร์ลิฟท์ (อำนวย สุขเหมือน, 2521) จะมีรูปแบบที่แตกต่างออกไป โดยน้ำหมักจะไหลหมุนเวียนผ่านท่อปล่อนย้อนกลับ ภายในคอลัมน์ ซึ่งจะช่วยให้เกิดการผสมผสานของน้ำหมัก

ตลอดความยาวของคอลัมน์ได้ดีขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนลงสู่น้ำหมักได้มากกว่าแบบคอลัมน์ ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการถ่ายเทออกซิเจนลงสู่น้ำหมักจะมีขีดจำกัดน้อยกว่าแบบถังกวน แต่ก็เป็นแบบที่ประหยัดการใช้พลังงานและเป็นแบบที่เหมาะสม ใช้แทนเครื่องหมักถังกวนได้ดี นอกจากนี้ยังเหมาะกับการใช้งานในบริเวณที่มีปัญหาเรื่องพื้นที่ดินน้อย และสามารถดัดแปลงเป็นการผลิตในระบบต่อเนื่องได้ง่าย เนื่องจากไม่มีส่วนที่เคลื่อนไหว จากการทดลองนำเครื่องหมักแบบคอลัมน์ไปใช้ในการหมักในระบบไม่ต่อเนื่อง และกึ่งต่อเนื่องทั้งในห้องทดลองและเครื่องต้นแบบพบว่ามีทาง เป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

3.2.3 เครื่องหมักชนิดผสม

เป็นเครื่องหมักชนิดถังกวนและหอสูงมาผสมกันมีใบกวน และตัวกระจายอากาศพร้อม ๆ กัน