บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ในการหมักน้ำส้มสายชูที่จะให้ผลผลิตที่ดี รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายน้อย ต้องเกิดจากองค์ประกอบหลายอย่าง ดังนี้

2.1 เครื่องหมัก

ในปี ค.ศ.1670 ได้มีชาวฝรั่งเศสทำการหมักน้ำส้มสายชู โดยใช้ถังที่มีความจุ 200 ลิตร ใส่น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดี และยังไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์ (pasteurize) ลงไป 1 ใน 3 ของถัง แล้วเติมไวน์ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการทำน้ำส้มสายชูลงไป 10-15 ลิตร ทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ พอถึงสัปดาห์ที่ 5 ก็ดึงเอาน้ำส้มสายชู 10-16 ลิตรออกจากถังหมัก ซึ่งจะเห็นได้ว่าถ้าทำแบบวิธีนี้จะมีน้ำส้มสายชูออกทุกสัปดาห์ และในขณะเดียวกันก็เติมไวน์ลงทุกสัปดาห์เช่นกัน กรรมวิธีการนี้เป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุดเรียกกันทั่ว ๆ ไปว่า Orleans Process หรือ French Process หรือ Slow Process(5,8,21)ข้อดีของวิธีการนี้คือได้น้ำส้มสายชูที่มีกลิ่น และรสดี ส่วนข้อเสียคือ กินเวลานาน (1-3 เดือน) ในปี ค.ศ.1732 Boerhaave .ชาวฮอลันดา ได้สร้างเครื่องหมักแบบ Quick Vinegar Process หรือ German Process ขึ้นมา โดยให้ไวน์หยดผ่านแพคเบดที่แพคกันอย่างหลวม ๆ (lossy material) พบว่า ใช้ระยะเวลา ในการผลิตน้ำส้มสายชูสั้นกว่าวิธีการของ Orleans Process (21) ต่อมาในปี ค.ศ.1823 Schuzenbach ชาวเยอรมันได้ปรับปรุงวิธีการของ Boerhaave ให้ดีขึ้นโดยใช้แพคเบดที่มีรูพรุน (porus materials) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส โดยให้เชื้อจุลินทรีย์มีโอกาสสัมผัสกับน้ำหมัก (ไวน์) และอากาศมากขึ้น โดยให้ไวน์หยดผ่านแพคเบดที่บรรจุอยู่ที่กันถังด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก ทางด้านล่างของเครื่องหมักจะมีตัวให้อากาศ ส่วนด้านบนของเครื่องหมักมีมอเตอร์หมุนเพื่อให้มีการกระจายของฟองอากาศอย่างสม่ำเสมอ ตามปกติเครื่องหมักแบบ German Process จะมีอัตราส่วนของความสูงกับเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 ต่อ 1 แต่อย่างไรก็ตามในเวลาต่อมาก็ได้มีการปรับปรุงเครื่องหมัก

น้ำส้มสายชูให้ดีขึ้นกว่าเดิม ในปี ค.ศ. 1932-1937 **Frings** (21) ได้เพิ่มระบบการหมุนเวียนของน้ำหมักเข้าไปด้วย โดยอาศัยหลักการเช่นเดียวกับ **German Process** แต่เครื่องหมักที่ **Frings** สร้างขึ้นสมบูรณ์แบบมากในสมัยนั้น เพราะว่ามีระบบควบคุมตามจุดต่าง ๆ ของเครื่องหมัก เช่น เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ อัตราการไหลของน้ำหมัก และ เทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิของน้ำหมักอีกด้วย วิธีการของ **Frings** คือ ให้น้ำหมักไหลผ่านเศษไม้ (**beechwood shaving**) และไหลวนอยู่ในท่อสองชั้น ซึ่งท่อด้านในทำด้วยแสตนเลส ส่วนท่อด้านนอกทำด้วยทองแดงบรรจุน้ำหล่อเย็น น้ำหมักที่ผ่านลงสู่ถังหมักจะถูกปั๊มขึ้นสู่ทางด้านบนของถังใหม่ โดยใช้ปั๊มหมุนเหวี่ยง (**Centrifigal pump**) ส่วนอากาศจะให้ทางด้านล่างของเครื่องหมัก วิธีการของ **Frings** สามารถเปลี่ยนเอทานอลร้อยละ 10 โดยปริมาตร และกรดอะซีติกร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ให้ได้กรดอะซีติกร้อยละ 6.8 ภายใน 8-10 วัน จากนั้นจะดึงเอาน้ำส้มสายชูที่ได้ออกร้อยละ 92 และจะใส่ไวน์ลงไปเท่ากับจำนวนที่ดึงออก ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ ไป ปัจจุบันวิธีการของ **Frings** ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เพราะว่าผลิตได้มากเป็น 30 เท่าของเครื่องหมักที่ไม่มีการไหลเวียนของน้ำหมัก (21) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันได้มีเครื่องหมักแบบใหม่ขึ้นมาคือ **Submerged Vinegar Fermenter** (5, 8,21) เป็นเครื่องหมักที่ใช้ถังทรงสูง หรือแบบคอลัมน์ ไม่มีการใส่แพคเบด แต่มีการกวนและการให้อากาศอย่างรุนแรง เพื่อให้อากาศและเชื้อจุลินทรีย์กระจายอย่างสม่ำเสมอในน้ำหมัก ซึ่งมีข้อดีหลายประการด้วยกันคือ

- สามารถผลิตกรดอะซีติกได้รวดเร็วกว่า **Frings** และ **German Process**
- ไม่ต้องใส่แพคเบด จึงไม่มีปัญหาเรื่องอุดตัน
- ใช้เนื้อที่น้อย เพราะว่าเป็นถังทรงสูง

แต่ก็มีข้อเสียคือ

- ใช้พลังงาน และค่าใช้จ่ายสูง
- ต้องมีการให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดเวลา หากเกิดการขัดข้องของเครื่องมือไม่มีอากาศเข้าสู่น้ำหมักภายในเวลา 1 นาที เชื้อจุลินทรีย์จะหยุดการเจริญเติบโต และจะใช้เวลานานกว่าจะฟื้นคืนสู่สภาพเดิมภายหลังให้อากาศใหม่ นอกจากนี้แล้วยังต้องควบคุมให้ฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปมีขนาดเล็กตลอดคอลัมน์ด้วย ซึ่งจะเห็นได้ว่า วิธีการแบบ **Submerged**

นี้ควบคุมลำบาก ถึงแม้จะให้ผลผลิตรวดเร็วก็ตาม (8,21)

ในปี ค.ศ. 1977 คุณศุภมาศ ภมรบุตร ได้ศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำสับปะรด (3) โดยใช้ raching ring (ไม้ไผ่) เป็นแพคเบด อัตราการไหลเข้าของน้ำหมัก 1 ลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิตน้ำส้มสายชูได้ร้อยละ 4 ภายใน 60 ชั่วโมง แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือ ผลิตได้น้อย ในงานวิจัยนี้เป็นงานต่อเนื่องจากวิทยานิพนธ์ของคุณนิคม ศิปะวาโร ซึ่งทำการศึกษาเครื่องหมักแบบคอลัมน์ในการผลิตยีสต์ เอทานอล และน้ำส้มสายชูจากน้ำสับปะรด (1) ผลปรากฏว่า ในการผลิตน้ำส้มสายชูนั้นให้ผลไม่ดี แต่ข้อมูลของคุณนิคม ศิปะวาโร มีแนวโน้มในการที่จะผลิตน้ำส้มสายชูด้วยเครื่องหมักแบบคอลัมน์ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดแพคเบดในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด โดยอาศัยข้อดีจากวิธีการของ Frings, Submergs และข้อมูลของคุณนิคม ศิปะวาโร แต่ใช้ไม้ทรงกลมเป็นแพคเบดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร

2.2 การเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการหมัก

ในธรรมชาติมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตน้ำส้มสายชูจากสารละลายวัตถุดิบที่มี เอทานอล ซึ่งเราเรียกกันโดยทั่ว ๆ ไปว่า acetic acid bacteria หรือ vinegar bacteria เซลล์ของแบคทีเรียพวกนี้จะมีลักษณะเป็นท่อน (rod) หรือรูปรี (ellipsoidial to long (21) เซลล์ที่มีอายุน้อยจะเป็นแกรมลบ (gram negative) ไม่มีการสร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ มีแฟลคเจลล่า (flagella) เป็นโพล่า (polar) และเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต ในหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (21) ได้แบ่งแบคทีเรียสกุล Acetobacter ไว้หลายสายพันธ์ด้วยกัน

A. aceti
A. pasteurianus
A. kuetzingianus
A. xylinum
A. roseus
A. oxydans
A. rancens
A. melanogenus
A. suboxydans

นอกจากนั้นแล้ว B Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ยังได้แบ่ง Acetobacter ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

- พวกที่สามารถออกซิไดซ์กรดอะซีติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้
- พวกที่ไม่สามารถออกซิไดซ์ กรดอะซีติกได้

สำหรับพวกที่ออกซิไดซ์กรดอะซีติกได้ยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยแบ่งตามความสามารถในการใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งของไนโตรเจนได้เช่น A. aceti สามารถใช้เกลือแอมโมเนียมได้ ส่วนพวกที่ไม่สามารถใช้เกลือแอมโมเนียมได้เช่น A. xylinum ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะสร้างเมือกหนา ๆ ที่ผิวหน้าของอาหาร แต่ A. rancens, A. pasteurianus, A. kuetzingianus นี้ไม่สามารถสร้างเมือกได้

- พวกที่ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดอะซีติกได้เช่น A. melanogenus ซึ่งจะสร้างสีน้ำตาล หรือดำในอาหารที่มีกลูโคส โดยทั่ว ๆ ไป Acetobacter มีความสามารถผลิตกรดอะซีติกจากการออกซิไดซ์เอทานอลได้ในช่วงร้อยละ 2-12 แบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วนั้นสามารถผลิตกรดอะซีติก ได้สูงสุดจากเอทานอลดังต่อไปนี้

A.	aceti	6.6% alcohol
A.	oxydans	2% alcohol
A.	kuetzingianus	6.6% alcohol
A.	xylinum	4.5% alcohol

ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเพื่อนำมาใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูนั้น นอกจากความสามารถในการผลิตแล้ว ยังต้องคำนึงถึงความสามารถในการเจริญเติบโตในสูตรอาหารอย่างง่าย ๆ และไม่ควรจะออกซิไดซ์น้ำส้มสายชูอีกด้วย

2.3 คุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้

น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดีนั้นขึ้นกับวัตถุดิบที่ใช้ เช่นผลไม้ควรจะสะอาด มีคุณภาพดี ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป ถ้าเป็นไวน์หรือวัตถุดิบที่มีเอทานอลอยู่ด้วยก็ควรจะใสสะอาด และไม่มีสารกันบูดเจือปน วัตถุดิบที่สามารถนำมาทำน้ำส้มสายชูได้มีหลายอย่าง เช่น สับปะรด องุ่น

แอปเปิล กล้วย อ้อย เป็นต้น (19)

ในการหมักน้ำส้มสายชูนั้นจะเกี่ยวข้องกับปฏิกริยาทางชีวเคมี 2 ขั้นตอนด้วยกันคือ

2.3.1 ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล (13,21)

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{yeast enzyme}} 2C_2H_5OH + 2CO_2 \quad \text{——— (2.1)}$$

2.3.2 เชื้อ **Acetobacter** จะเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดอะซีติกโดยปฏิกริยาดีไฮโดรจิเนชัน (Dehydrogenation) ด้วยเอ็นไซม์ **alcohol dehydrogenase** ซึ่งจะได้ **acetaldehyde** (21)

$$C_2H_5OH \longrightarrow CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H + H_2O \quad \text{——— (2.2)}$$

acetaldehyde ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกริยากับน้ำเป็น **hydrate acetaldehyde** โดยปฏิกริยา **Condensation**

$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H + H_2O \longrightarrow CH_3\overset{H}{\overset{|}{C}}-OH \quad \text{——— (2.3)}$$
$$\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad H$$

จากนั้น **hydrate acetaldehyde** จะทำปฏิกริยากับออกซิเจนโดยเอ็นไซม์ **alcohol dehydrogenase** เป็นตัวเร่งจะได้กรดอะซีติก

$$CH_3-\overset{H}{\overset{|}{C}}-OH + [O] \longrightarrow CH_3COOH + H_2O \quad \text{——— (2.4)}$$
$$\qquad\qquad\quad H$$

acetaldehyde ที่เกิดขึ้นอาจจะทำปฏิกริยาซึ่งกันและกัน ซึ่งเรียกว่า **Canmizaro** ได้กรดอะซีติก และ เอทานอล (21)

$$2CH_2COH \xrightarrow{H_2O} CH_3COOH + C_2H_5OH \quad \text{——— (2.5)}$$

2.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก

อุณหภูมิที่จะใช้ในการหมักนั้นขึ้นกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ และกรรมวิธีในการผลิตเช่น

A. xylinum อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 28 องศาเซลเซียส (20) แต่โดยทั่วไปเชื้อ Acetobacter จะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรจะต่ำหรือสูงกว่า 27-34 องศาเซลเซียส (20) เพราะว่าถ้าต่ำกว่านี้จะทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ลดต่ำลง แต่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงไปจะทำให้ เอทานอล กรดอะซีติก และสารที่ระเหยได้ง่ายจะระเหยไป

2.5 สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต

โดยปกติแล้วเชื้อจุลินทรีย์ก็เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่ต้องการอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งความสามารถในการใช้สารอาหารนั้น เชื้อจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารที่มีสูตรอย่างง่าย ๆ ก่อน ต่อจากนั้นจึงจะใช้สารอาหารที่ซับซ้อน (Complex compound) แต่โดยทั่ว ๆ ไป Acetobacter ต้องการสารอาหารพวกสารประกอบไนโตรเจน สารประกอบคาร์บอน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ (21)

2.5.1 สารประกอบไนโตรเจน

เชื้อ Acetobacter ต้องการไนโตรเจนเพื่อการสังเคราะห์โปรตีน และกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) แต่อย่างไรก็ตาม สารประกอบไนโตรเจนที่เติมลงไปนั้นควรจะคำนึงถึงชนิดของ Acetobacter ด้วยเพราะว่า ความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้ต่างกัน ดังเช่นในปี ค.ศ.1925 Vissert Hoft และในปี ค.ศ.1943 Vaughn ได้แบ่งชนิดของ Acetobacter ตามความสามารถในการใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งของไนโตรเจน ดังเช่นในปี ค.ศ.1953 Hall et al. ได้รายงานไว้ว่า A. aceti สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มี กลูโคส และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท ($(NH_4)_2HPO_4$) อยู่ด้วย (21)

2.5.2 สารประกอบคาร์บอน

เชื้อ Acetobacter ไม่สามารถเจริญได้ดีถ้าไม่มี เอทานอล เป็นส่วนประกอบทั้ง ๆ ที่มีสารอาหารเสริมอย่างอื่นครบถ้วน (21) เช่นในปี ค.ศ.1868 Pasteure ได้กล่าวไว้ว่า A. aceti จะเจริญได้ดีในเอทานอล และ กรดอะซีติก ต่อมาใน ค.ศ.1898

Berjerinek และ Hoyer ได้เสริมอีกว่านอกจาก เอทานอล และกรดอะซีติกแล้ว เกลือแร่ เกลือแอมโมเนียม กลูโคส ฟรุคโตส แมนนิทอล ยีสต์แอกแทรคท์ ก็มีส่วนช่วยให้การเจริญเติบโตของเชื้อ A. aceti ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม สารอาหารดังกล่าวที่นอกเหนือจากเอทานอลแล้วจะถูกนำมาใช้ในระยะเริ่มแรกของการหมักเท่านั้น แต่เมื่อการหมักดำเนินไปได้ระยะหนึ่งก็จะใช้เอทานอลเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน (21)

2.5.3 วิตามิน

เชื้อ Acetobacter นั้นต้องการวิตามินบีรวมมากกว่าวิตามินอย่างอื่น (21) เช่น ยีสต์แอกแทรคท์ มอลท์แอกแทรคท์ เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเติมสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโตลงไปบางส่วน (21)

2.6 เอทานอลและกรดอะซีติก

U.S. Patent Office (12) ได้รายงานการหมักน้ำส้มสายชูด้วยวิธีการแบบ Submerg ไว้ว่า อิทธิพลของความเข้มข้นทั้งหมด (ซึ่งหมายถึงกรัมของกรดอะซีติก ต่อ 100 มิลลิลิตร+เอทานอลร้อยละโดยปริมาตร) และความเข้มข้นของ เอทานอล และกรดอะซีติกนั้นจะมีผลต่ออัตราการเพิ่มของ Acetobacter ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ถ้าความเข้มข้นทั้งหมดเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของ Acetobacter จะลดลงโดยที่ตัวแปรอื่น ๆ คงที่ และถ้าความเข้มข้นทั้งหมดคงที่ อัตราการแบ่งตัวของเชื้อจะสูงสุดที่กรดอะซีติกร้อยละ 7-8 และจะลดลงถ้ากรดอะซีติกสูงขึ้น ดังนั้นทุก ๆ ครั้งของการหมักต้องเอากรดอะซีติกออกบางส่วน เพื่อให้ปริมาณกรดอะซีติกในน้ำส้มสายชูอยู่ในช่วงที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกรดอะซีติกและเอทานอลนี้ต้องขึ้นกับชนิดของ Acetobacter ด้วย ตามหัวข้อ (2.2)

2.7 อัตราการให้ออกซิเจน

เนื่องจาก Acetobacter เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนมาก ดังนั้นในการหมักต้องให้อากาศอย่างเพียงพอ ดังเช่น

$$C_2H_5OH + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow CH_3COH + H_2O$$

$$CH_3COH \xrightarrow{\frac{1}{2}O_2} CH_3COOH$$

U.S.Patent Office (12) ได้รายงานไว้ว่าที่ความเข้มข้นทั้งหมดร้อยละ 5 นั้น ถ้าขาดออกซิเจน 120 วินาทีจะทำให้เชื้อตายไปร้อยละ 34 และที่ความเข้มข้นทั้งหมดร้อยละ 12 เชื้อจะตายไปร้อยละ 34 เช่นกัน ถ้าขาดออกซิเจนภายใน 10-12 วินาที (12) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอจะมีส่วนสำคัญมากที่จะต้องคำนึงถึง

2.8 แพคเบด (Packed-bed)

ปฏิกริยาการเกิดกรดอะซีติก เป็นปฏิกริยาออกซิเดชั่น วิธีที่จะให้น้ำหมักมีโอกาสสัมผัสกับอากาศมากที่สุด ทำได้โดยการใส่แพคเบดลงไปในเครื่องหมัก หรือโดยการกวนอย่างรุนแรง หรือโดยการพ่นอากาศด้วยหัวละลายอากาศที่มีประสิทธิภาพ (7)

เพื่อให้เกิดความเข้าใจอันดีเกี่ยวกับการศึกษาเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดแพคเบด ควรทราบถึงจลน์ศาสตร์ของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย

2.9 จลน์ศาสตร์ของการหมัก (Fermentation kinetics)

จลน์ศาสตร์ในการหมักไม่เพียงแต่จะบอกเซลล์ที่แข็งแรงเท่านั้น (active cell growth) แต่ยังบอกถึงการเจริญเติบโตของเซลล์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วย (product formation) การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ตามปกติมักจะบอกในรูปของเวลาที่ต้องการทำให้น้ำหนักเซลล์ (cell mass) หรือจำนวนเซลล์ (cell number) เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า แต่เวลาที่ใช้ในการทำให้น้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้น 2 เท่า จะแตกต่างกับเวลาที่ทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เพราะว่าน้ำหนักเซลล์สามารถเพิ่มขึ้นได้โดยที่จำนวนเซลล์ยังคงที่ (25) อย่างไรก็ตามสามารถที่จะอธิบายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ด้วยสมการ

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \qquad \text{——— (2.6)}$$

X = ความเข้มข้นของเซลล์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็น (ชั่วโมง$^{-1}$)

จากสมการที่ 2.6 ทำให้อยู่ในรูปของ $\ln \frac{X_2}{X_1} = \mu \Delta t$ ——— (2.7)

จากสมการ 2.7 สามารถหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะได้ (μ) โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่าง ln X กับเวลา

2.9.1 วิธีการที่จะวัดการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ (Methods for Measuring microbial growth)

วิธีการที่จะวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีหลายวิธี

2.9.1.1 วัดจำนวนเซลล์ (Measurement of cell Number) ซึ่งอาจใช้วิธีการ Microspcopic Count, Viable Plate Count, Slide Culture เป็นต้น

2.9.1.2 วัดน้ำหนักเซลล์ (Measurement of cell mass) อาจวัดโดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell Dry Weight) หรือวัดความขุ่น (Turbidity) ก็ได้ ดังสมการ

$$-\frac{d I_t}{dL} = \varepsilon I_t C \qquad \text{(2.8)}$$

ε = molar absorption coefficient

C = ความเข้มข้นของเซลล์

I_t = ความเข้มของแสง ที่ผ่านหลอดแก้ว L เมื่อเวลาใด ๆ

จากสมการ 2.6 จะได้ว่า

$$\ln \frac{I_t}{I_o} = -\varepsilon CL \qquad \text{(2.9)}$$

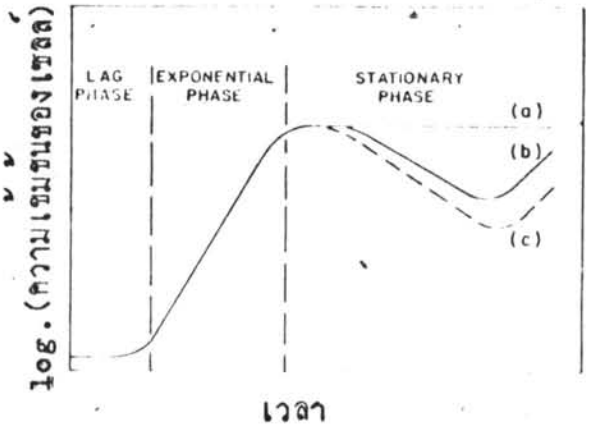
I_o = ความเข้มของแสง ที่ผ่านหลอดแก้วยาว L เมื่อเวลา t_o

L = ความยาวของหลอดแก้วคิวเวท (cuvet) ปกติมักจะใช้ความยาว 1 เซนติเมตร โดยทั่ว ๆ ไปความยาวคลื่นที่ใช้ในการวัดความขุ่นของเซลล์ มักจะวัดในช่วง 500-700 นาโนเมตร (nm)

จากสมการ 2.9 สามารถที่จะหาความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln \frac{I_t}{I_o}$ กับ c ได้ ซึ่งจะได้กราฟเส้นตรงมีความชัน = $-\varepsilon L$

2.9.2 จลน์ศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Kinetics of Microbial Growth and Product Formation)

- จลน์ศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ (kinetics of Cell Growth) ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พอจะแบ่งจลน์ศาสตร์ออกได้ 3 ขั้นตอนคือ



(Wang, Daniell, 1979. "Fermentation and Enzyme Technology")

ในช่วง exponential phase นั้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะเป็นฟังก์ชั่นกับความเข้มข้นของสารอาหาร เพราะว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะก็คล้าย ๆ กับอัตราการเกิดปฏิกริยาเคมี ซึ่งจะเป็นฟังก์ชั่นกับความเข้มข้นทางเคมี ซึ่งในที่นี้ก็คือสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ซึ่ง Monod (1949 X4) ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโต และความเข้มข้นของสารอาหารว่าคล้าย ๆ กับ Langmuir monomolecular adsorption Isotherm (LI) ดังนั้น LI นี้ สามารถที่จะดัดแปลงมาใช้กับการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดังสมการ

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k_s + S} \qquad \text{——— (2.10)}$$

Monod model for unicellular growth (11,25)

μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

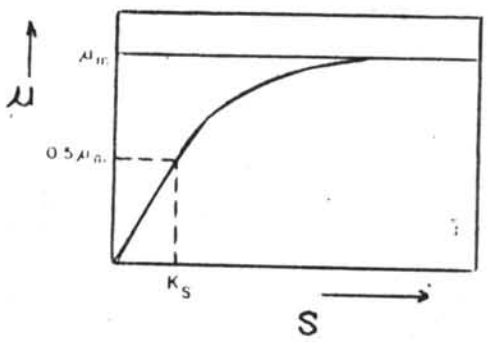
μ_{max} = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด เมื่อความเข้มข้นของสารอาหารไม่มีขอบเขตจำกัด (maximum specific growth rate)

S = ความเข้มข้นของสารอาหาร

k_s = ค่าคงที่ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/ลิตร

จากสมการ 2.10 เมื่อ $S = k_s$ จะได้ว่า

$$\mu = \frac{1}{2}\mu_{max} \qquad \text{——— (2.11)}$$



The Monod model for microbial growth

(Wang, Daniell, 1979. "Fermentation and Enzyme Technology")

Monod Model for microbial growth ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่า μ จะขึ้นกับความเข้มข้นของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตเท่านั้น (limiting nutrient concentration) (Wang, Daniell, 1979.)

นั่นก็คือ อัตราการเจริญเติบโตจะเป็นฟังก์ชันกับความเข้มข้นของเซลล์ (cell mass) และความเข้มข้นของสารอาหาร

$$\frac{dX}{dt} = f(X,S) \qquad \text{——— (2.12)}$$

X = น้ำหนักเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร

S = ความเข้มข้นของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตเท่านั้น (concentration of growth limiting, substrate)

จากสมการที่ 2.12 จะได้ว่า

$$\mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt} \qquad \text{——— (2.13)}$$

"exponential growth equation."

จากสมการที่ 2.10 และ 2.13 จะได้ว่า

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \cdot \frac{S}{k_s + S} \cdot X \qquad \text{——— (2.14)}$$

จากสมการที่ 2.10 ถ้า $\mu = \mu_{max}$ แสดงว่า $k_s << S$ ซึ่งจะได้ว่า

$$\mu_{max} = \frac{d \ln X}{dt}$$

$$\int d \ln X = \int \mu_{max}\, dt$$

$$\ln X \Big|_{X_o}^{X} = \mu_{max} (t - t_o)$$

$$\ln \frac{X}{X_o} = \mu_{max} (t - t_o) \qquad \text{——— (2.15)}$$

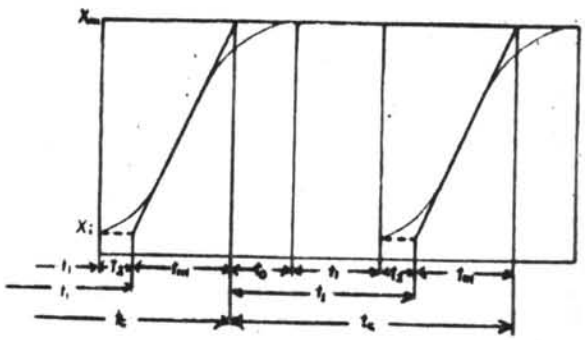
$$\frac{X}{X_o} = e^{\mu max (t - t_o)}$$

$$X = X_o\, e^{\mu max (t - t_o)} \qquad \text{——— (2.16)}$$

t_o = เวลาเริ่มต้นใน exponential phase

X_o = น.น.เซลล์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรที่ $t = t_o$

จากสมการที่ 2.16 นั้น เวลาที่แสดงในรูปของ t และ t_o นั้นจะเป็นระยะเวลาที่ใช้ในการหมักเฉพาะในช่วง **exponential phase** เท่านั้น แต่จริง ๆ แล้วในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องนั้นใช้ระยะเวลานานมาก ดังจะแสดงในรูป



004173

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์กับเวลาที่ใช้ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

(Aiba, Humphrey, 1965. "Biochemical Engineering")

t_m = เวลาที่ใช้ในช่วง, **exponential phase**

t_o = **harvest period**

t_1 = เวลาที่ใช้ในการเตรียมระหว่างที่จะทำการหมักต่อไป

t_2 = เวลาที่ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม

t_c = เวลาที่ใช้ทั้งหมดในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องแต่ละครั้ง

$$t_c = t_m + t_o + t_1 + t_2$$

$$= t_m + t_1 \qquad \text{———— (2.17)}$$

$$t_1 = t_o + t_1 + t_2$$

X_i = น.น.เซลล์เริ่มแรก (**initial cell concentration**)

X_m = น.น.เซลล์สูงสุด (maximum cell concentration)

ดังนั้นจากสมการที่ 2.16 ถ้าจะคิดเวลาที่ใช้ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องแต่ละครั้ง จะได้ว่า

$$t_c = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \frac{M_m}{X_i} + t_l \qquad \text{——— (2.18)}$$

ซึ่ง $\frac{1}{\mu_{max}} \ln \frac{X_m}{X_i} = t_m$ นั่นเอง ดังสมการที่ 2.18

ซึ่งจากสมการที่ 2.18 จะเห็นได้ว่า ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องแต่ละครั้งจะเสียเวลาในช่วง t_l ไปโดยเปล่าประโยชน์ ซึ่งเวลาที่เราสนใจจริง ๆ คือเวลาในช่วง t_m เท่านั้น ซึ่งข้อนี้เองที่เป็นส่วนเสียเปรียบ เมื่อเปรียบเทียบเวลาในการหมักระหว่างการหมักแบบต่อเนื่องและการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง เพราะว่าในระยะเวลาที่เท่ากับการหมักแบบต่อเนื่องจะได้จำนวนผลิตภัณฑ์มากกว่า ซึ่งจากข้อเสียนี้เองที่ทำให้การทดลองครั้งนี้ศึกษาถึงการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่องด้วย