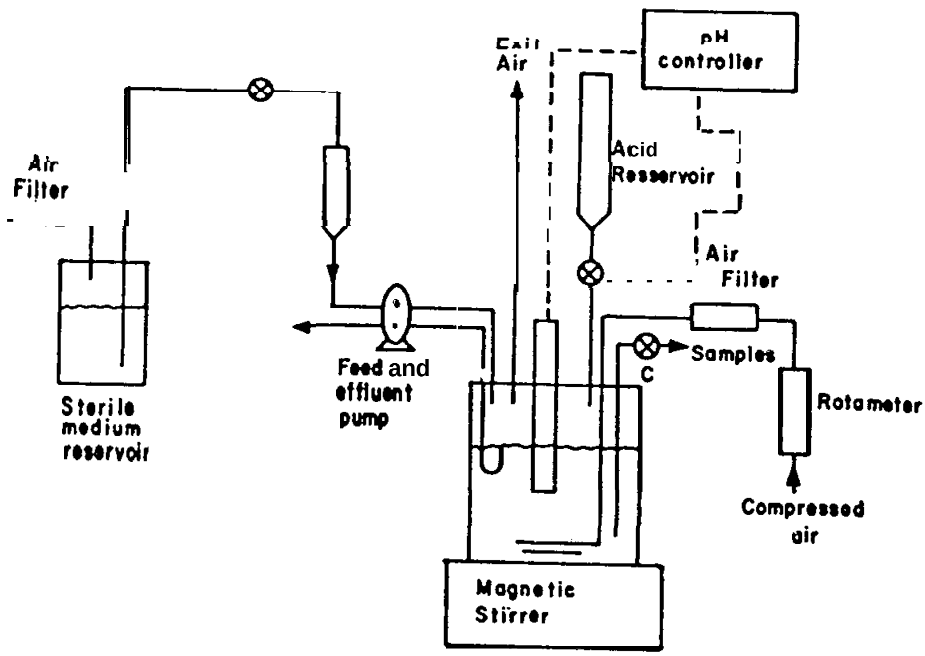
# บทที่ 5
# จลนพลศาสตร์การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง เป็นการแปรรูปหรือการเพาะเลี้ยงที่รักษาสภาวะต่างๆภายในถังปฏิกรณ์ให้อยู่ในสภาพที่คงที่ (steady state) ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องนี้ จะให้ผลผลิต (productivity) ที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเบชท์ แต่มีปัญหาที่สำคัญ คือ การปนเปื้อนที่เกิดได้ง่าย และต้องการระบบควบคุมที่ซับซ้อนกว่า

**การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยวิธีคีโมสแตท** (Chemostat cultivation)

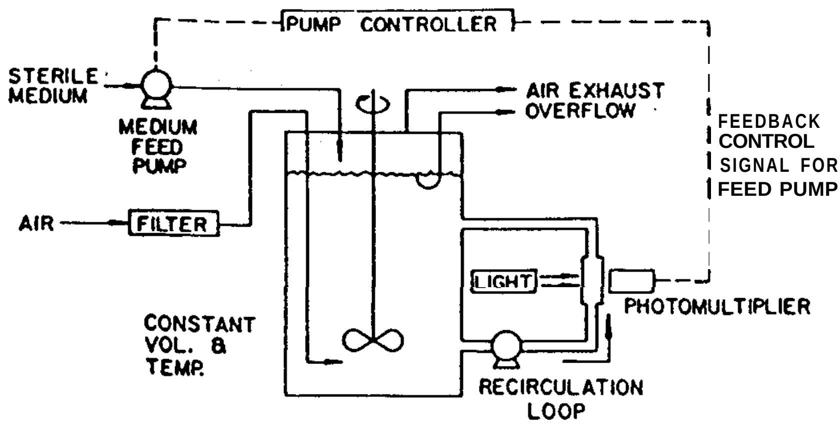
ลักษณะการเพาะเลี้ยงแบบนี้ เป็นการควบคุมปริมาณน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ให้คงที่ตลอดเวลา โดยการควบคุมให้อัตราการเติมสารอาหารลงไปในถังปฏิกรณ์เท่ากับอัตราการดึงเอาน้ำหมักออกจากระบบ ทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะถูกควบคุมโดยสภาพแวดล้อมทางเคมี ซึ่งในที่นี้ได้แก่ ความเข้มข้นของสับสเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ




รูปที่ 11 แสดงการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยวิธีคีโมสแตท

**การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยวิธีเทอร์บิโดสแตท** (Turbidostat Cultivation)

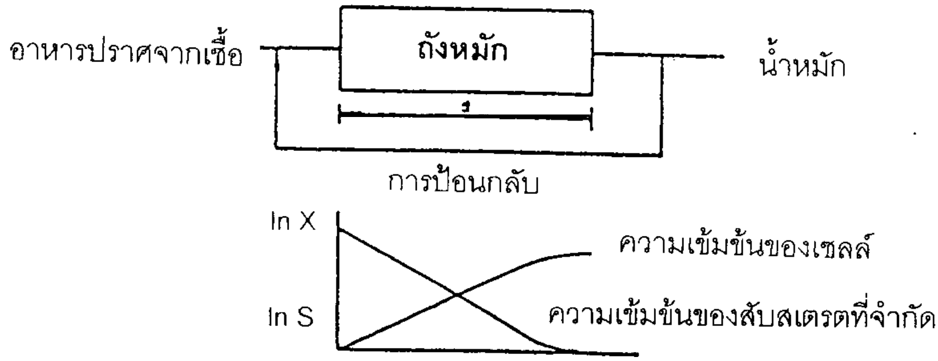
การเพาะเลี้ยงแบบนี้ เป็นการวัดความขุ่นของน้ำหมัก เพื่อรักษาสภาวะต่างๆภายในถังปฏิกรณ์ให้คงที่ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโดยวิธีเทอร์บิโดสแตทนี้ จะมีส่วนของ photoelectric cell เพิ่มขึ้นมา ถ้าความหนาแน่นของเซลล์ในถังปฏิกรณ์เพิ่มขึ้นกว่าความเข้มข้นที่กำหนดไว้ สัญญาณให้มีการเติมอาหารจาก photoelectric cell จะถูกส่งมาเพื่อการควบคุมอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม เพื่อให้มีปริมาณเซลล์ที่คงที่ โดยการเจือจางปริมาณเซลล์ในขณะเดียวกันปริมาณของน้ำหมักที่เกินจะถูกดึงออกไปเพื่อควบคุมปริมาตรของน้ำหมักให้คงที่




รูปที่ 12 แสดงการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยวิธีเทอร์บิโดสแตท

**การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยวิธีฟลักโฟล** (Plug Flow)

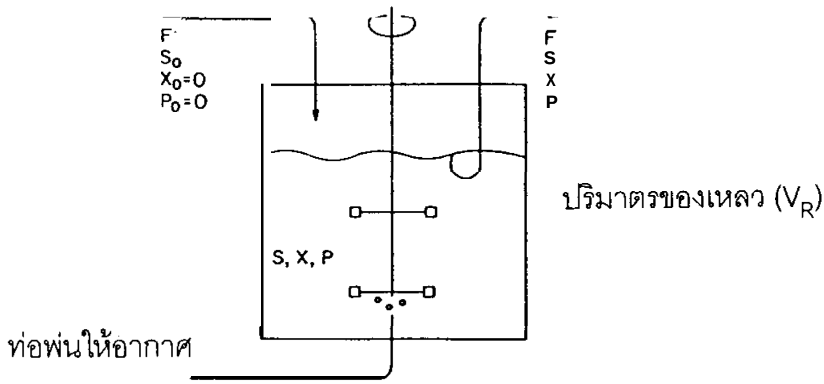
การเพาะเลี้ยงแบบนี้ทั้งปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ ปริมาณสารอาหาร ตลอดจนปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะทางที่เซลล์จุลินทรีย์เคลื่อนที่ผ่านไป




รูปที่ 13 แสดงการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง โดยวิธีฟลักโฟล

**การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ในถังเดียว** (Single State Chemostat)

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องในถังเดียว เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องที่ง่ายที่สุด และเมื่อพิจารณาสมดุลมวลต่างๆที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะมวลของจุลินทรีย์ซึ่งเปรียบเสมือนเป็นสารเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ จึงทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยสมดุลดังกล่าวมักพิจารณาเมื่อระบบอยู่ในสภาวะคงที่ และกำหนดให้สับสเตรตที่จำกัดชนิดหนึ่งทำหน้าที่ควบคุมระบบ โดยที่




รูปที่ 14 แสดงการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง แบบถังเดี่ยว

อัตราการสะสมของเซลล์ = อัตราการเติมเซลล์ + อัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์ – อัตราของเซลล์ที่ออกจากระบบ – อัตราของเซลล์ที่ถูกทำลาย

$$\frac{dX}{dt} = FX_o - FX + \mu X - \alpha X$$

หรือ

$$\frac{dX}{dt} = \frac{F X_o}{V} - \frac{FX}{V} + r_X - \alpha X \qquad \text{สมการที่ 53}$$

เมื่อ $\alpha$ เป็นอัตราการตายจำเพาะ (specific death rate)

$\mu$ เป็นอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

F เป็นอัตราการไหลของสารอาหาร (flow rate)

V เป็นปริมาตรของน้ำหมัก (volume)

$X_o$ เป็นปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่มีในสารอาหารที่เติม (g/l)

X เป็นปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในถังหมัก (g/l)

ในกรณีที่เป็นการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ซึ่งมีการเติมสารอาหารอยู่ตลอดเวลา จนถือได้ว่าอัตราการตายไม่ค่อยเกิดขึ้น ดังนั้นจึงถือว่าค่า $\alpha$ มีค่าน้อยมาก และเมื่ออัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์มีค่ามากกว่าอัตราการตายจำเพาะ ($\mu >> \alpha$) จนอาจพิจารณาให้ $\alpha X$ มีค่าน้อยมากด้วย ในขณะเดียวกันถ้าระบบที่พิจารณาดังกล่าวเป็นการเติมเฉพาะสารอาหารเพียงอย่างเดียว ไม่มีการนำเอาเซลล์จุลินทรีย์เติมลงไปในระบบอีก ($X_o = 0$)

จากสมการที่ 53 จะได้ $\frac{dX}{dt} = \frac{-FX}{V} + \mu X$

หรือ $\frac{dX}{dt} = \frac{-FX}{V} + r_X$

เมื่อการเพาะเลี้ยงดังกล่าวเข้าสู่สภาวะคงที่

นั่นคือ $\frac{dX}{dt} = 0$

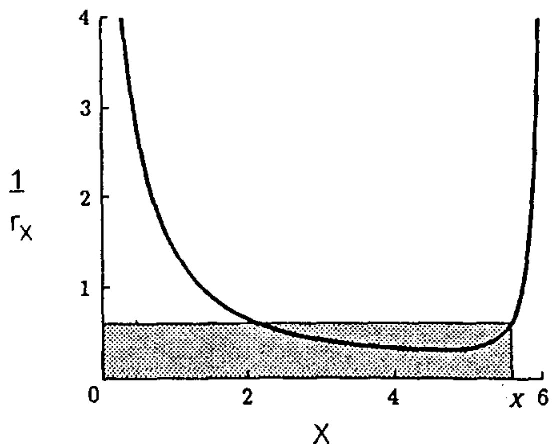
จะได้ $\dfrac{F}{V} = \mu$

$$\frac{F}{V} = \frac{x}{r_X}$$

โดยที่ $\tau_m = \dfrac{v}{F}$

$$= \frac{x}{r_X} \qquad \text{สมการที่ 54}$$

จากสมการที่ 54 เมื่อพิจารณาเวลาที่ต้องใช้ในการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่ต้องการ ซึ่งมีค่าเท่ากับพื้นที่สี่เหลี่ยมแรเงาที่ได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง X กับ $1/r_X$ ดังแสดงในรูปที่ 15




รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง X กับ $1/r_X$

จาก $\tau_m = \dfrac{1}{\mu} = \dfrac{1}{D}$

$$D = \mu$$

$$= \frac{1}{\tau_m}$$

$$= \frac{\mu_m S}{K_S + S}$$ สมการที่55

ในสภาวะที่คงที่ สามารถคำนวณ S ได้ เมื่อทราบค่า $\tau_m$

โดยที่ $$S = \frac{K_S}{\tau_m \mu_m -1}$$ สมการที่ 56

โดยที่ $\tau_m \mu_m$ มีค่ามากกว่า 1

ถ้า $\tau_m \mu_m$ มีค่าน้อยกว่า 1 จะมีผลทำให้อัตราการเจริญของเซลล์มีค่าน้อยกว่าอัตราการออกไปของเซลล์ ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปจะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีในถังหมักถูกชะล้างออกไป

จาก $$X = Y_{X/S} (S_i - S)$$ สมการที่57

เมื่อแทน S ในสมการที่ 56 ในสมการที่ 57

จะได้ $$X = \frac{Y_{X/S} ( S_i - K_s )}{\tau_m \mu_m -1}$$

$$P = P_o + \frac{Y_{P/S} ( S_i - K_s )}{\tau_m \mu_m -1}$$

**ตัวอย่างที่ 30** การเพาะเลี้ยงต่อเนื่องแบบคีโมสเตต โดยการใช้สารอาหารที่มีอัตราการไหลต่างๆ กัน เมื่อระบบเข้าสู่สภาวะที่คงที่ พบว่าความเข้มของเซลล์และกลูโคสที่มีในถังหมัก แสดงได้ดังตารางที่ 20 เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นกลูโคสที่ป้อนมีความเข้มข้นเป็น 100 กรัมต่อลิตร และปริมาตรของน้ำหมักในถังหมักคงที่เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

ตารางที่ 20 แสดงอัตราการไหล ความเข้มข้นของเซลล์ และความเข้มข้นของสับสเตรต

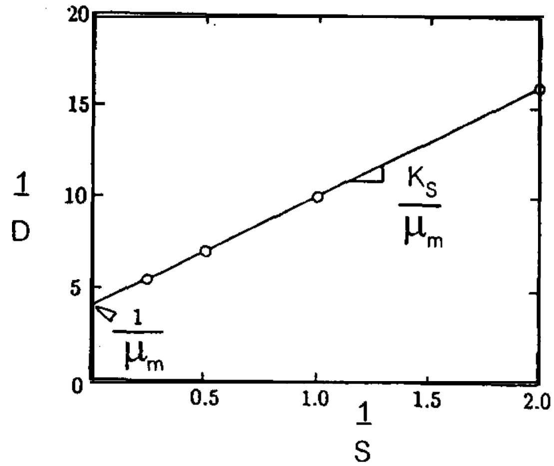
| อัตราการไหล F (ml/hr) | ความเข้มข้นของเซลล์ X (g/l) | ความเข้มข้นของสับสเตรต S (g/l) |
|---|---|---|
| 31 | 5.97 | 0.5 |
| 50 | 5.94 | 1.0 |
| 71 | 5.88 | 2.0 |
| 91 | 5.76 | 4.0 |
| 200 | 0 | 100 |

1. จงหาสมการอัตราการเจริญ ($r_X$)
2. จงหาอัตราการไหลที่ไม่ทำให้เกิดการชะล้าง

<u>วิธีทำ</u>

1.
$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m}\frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m}$$

เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{\mu}$ กับ $\frac{1}{S}$ จะได้ความชันเท่ากับ $K_S/\mu_m$ และจุดตัดบนแกน $1/\mu$ มีค่าเท่ากับ $1/\mu_m$




รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{\mu}$ กับ $\frac{1}{S}$

จากรูป 16 จะได้

$$\frac{1}{\mu_m} = 3.8$$

$$\frac{K_s}{\mu_m} = 5.2$$

ดังนั้น $\mu_m = 0.26\ hr^{-1}$

และ $K_s = 1.37\ g/l$

ดังนั้นสมการอัตราการเจริญ $r_X = \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m SX}{K_s + S}$

$$r_X = \frac{0.26\ SX}{1.37 + s}$$

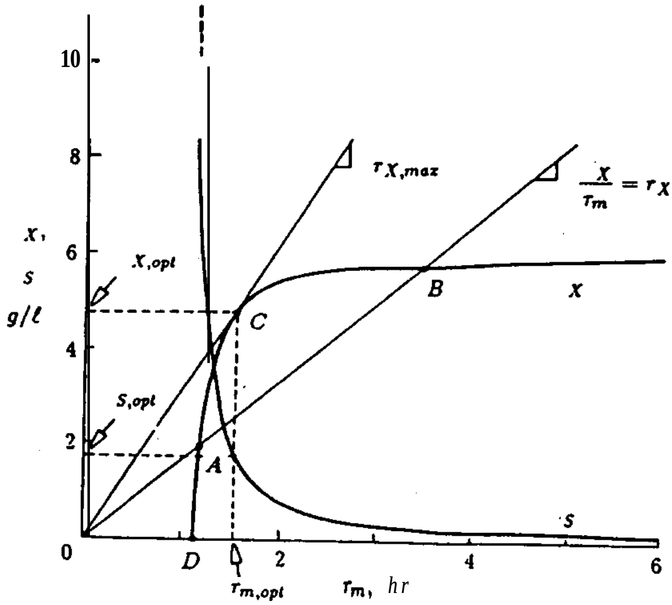
2. $$\tau_m = \frac{V}{F} > \frac{K_s + S_i}{S_i \, \mu_m}$$

ดังนั้น $$F < \frac{V S_i \, \mu_m}{K_s + S_i} = \frac{0.5\,(100)(0.26)}{1.37 + 100}$$

$$= 0.128 \ \mathrm{l/hr}$$

เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์และปริมาณสับสเตรตของกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่อัตราการป้อนต่างๆกัน เมื่อระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ แสดงได้ดังรูปที่ 17 โดยผลผลิตของเซลล์ที่ได้ สามารถคำนวณได้จากกราฟความชันของเส้นตรงที่ลากออกไปจากตำแหน่ง O เช่น เส้นตรง OAB และเส้นตรง OC ซึ่งมีค่าเท่ากับ $r_X$ หรือ $X/\tau_m$ ถ้าพิจารณาที่ตำแหน่ง A และตำแหน่ง B ที่อยู่บนเส้นตรง OAB เดียวกันแล้ว จะพบว่าที่สภาวะการเพาะเลี้ยงของตำแหน่ง A และตำแหน่ง B นั้นสามารถให้ผลผลิตที่เท่ากัน โดยสภาวะ A ของการเพาะเลี้ยงนั้น ทำให้ได้ปริมาณเซลล์ที่น้อยกว่า ในขณะเดียวกันเวลา $\tau_m$ มีค่าที่น้อยด้วยเช่นกัน ส่วนปริมาณสับสเตรตจะเหลืออยู่ในปริมาณที่สูงกว่า ในขณะที่สภาวะ B ของการเพาะเลี้ยง จะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มากกว่า แต่เวลา $\tau_m$ นั้นใช้เวลาที่นานกว่าเมื่อเปรียบเทียบสภาวะดังกล่าวแล้ว จะพบว่าสภาวะ B เป็นสภาวะที่มีความเสถียรกว่า เนื่องจากสภาวะ A เป็นสภาวะที่ใกล้กับสภาวะ D ซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้เกิดสภาพชะล้าง จึงทำให้การควบคุมสภาวะ A เป็นไปได้ยากและลำบาก

เมื่อพิจารณาเส้นตรงที่ลากจากจุด O ที่ทำให้ได้เส้นตรงที่มีความชันเพิ่มขึ้น หรือผลได้ของเซลล์มีค่าที่เพิ่มขึ้น จะพบว่าเส้นตรง OC นั้น เป็นเส้นตรงที่ทำให้ได้ผลผลิตของเซลล์สูงสุด ซึ่งสภาวะดังกล่าว จะมีค่า $\tau_m$ เท่ากับ $(\tau_m)_{opt}$ และปริมาณเซลล์ที่ได้ มีค่าเท่ากับ $X_{opt}$ และเมื่อพิจารณาสภาพที่ทำให้ได้ผลผลิตของเซลล์สูงสุดในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องนั้น สามารถแสดงได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/r_X$ กับ X ดังรูปที่ 15 โดยให้พื้นที่ใต้กราฟสี่เหลี่ยมผืนผ้านั้นมีพื้นที่น้อยที่สุด หรือเวลาที่ใช้ $\tau_m$ มีค่าน้อยสุดด้วย ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวจะ




รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ ปริมาณสับสเตรตของกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่อัตราการป้อนต่างๆ

เกิดขึ้นเมื่อ $1/r_X$ มีค่าน้อยที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 15 นอกจากการพิจารณาผลผลิตของเซลล์สูงสุดจากกราฟแล้ว ยังสามารถคำนวณ $X_{opt}$ $S_{opt}$ $\tau_{m.opt}$ และ $D_{opt}$ ได้จากสมการ โดยการกำหนดให้

$$\frac{dr_X}{dX} = 0$$

เมื่อ $X = Y_{X/S} (S_i - S)$

จะได้ $X_{opt} = Y_{X/S} \, S_i \left( \frac{\alpha}{\alpha + 1} \right)$

เมื่อ $a = \sqrt{\dfrac{K_S + S_i}{K_S}}$

เมื่อ $s = S_i - (X / Y_{X/S})$

จะได้ $s_{opt} = \dfrac{S_i}{\alpha + 1}$

และ $\tau_{m,opt} = \dfrac{a}{\mu_m (\alpha - 1)}$

$$D_{opt} = \mu_m \left(1 - \frac{K_S}{K_S + S_o}\right)$$

$$D_C = \frac{\mu_m S_o}{K_S + S_o} \qquad \text{สมการที่ 58}$$

เมื่อ $D_C$ เป็นอัตราการเจือจางที่ทำให้เกิดสภาพชะล้าง

จากสมการที่ 58 จะพบว่าอัตราการเจือจางที่ทำให้เกิดสภาพชะล้างนั้น จะแปรผันกับความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น เมื่อความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นมีค่ามากกว่า $K_S$ จะทำให้ $D_C$ มีค่าเท่ากับ $\mu_m$

**ตัวอย่างที่ 31** ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องคีโมสเตต ในถังหมักที่มีขนาด 5 ลูกบาศก์เมตร โดยการป้อนสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 20 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ถ้าลักษณะของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_m$) เป็น 0.45 ต่อชั่วโมง $K_S$ เท่ากับ 0.8 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร และผลได้ของการเจริญ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.55 กิโลกรัมต่อกิโลกรัม

1. จงคำนวณอัตราการป้อนที่สามารถทำให้กลูโคสถูกใช้ไปร้อยละ 90
2. จงคำนวณปริมาณเซลล์ที่ได้

<u>วิธีทำ</u>

1. จากการเปลี่ยนกลูโคสให้ได้ร้อยละ 90 แสดงว่า

$$S = 0.1\,S_i$$
$$= 0.1 \times 20$$
$$= 2\ \mathrm{kg\,m^{-3}}$$

จาก

$$D = \frac{\mu_m S}{K_S + S}$$
$$= \frac{(0.45\ \mathrm{h^{-1}})(2\ \mathrm{kg\,m^{-3}})}{(0.8\ \mathrm{kg\,m^{-3}}) + (2\ \mathrm{kg\,m^{-3}})}$$
$$= 0.32\ \mathrm{h^{-1}}$$

$$F = D\,V$$
$$= (0.32\ \mathrm{h^{-1}})\ (5\ \mathrm{m^{3}})$$
$$= 1.6\ \mathrm{m^{3}\,h^{-1}}$$

2.

$$X = \left(S_i - \frac{K_S D}{\mu_m - D}\right) Y_{X/S}$$

$$r_X = D\,X$$
$$= (0.32\,\mathrm{h^{-1}})\left(20\ \mathrm{kgm^{-3}} - \frac{(0.8\mathrm{kg\,m^{-3}})(0.32\ \mathrm{h^{-1}})}{(0.45\mathrm{h^{-1}} - 0.32\ \mathrm{h^{-1}})}\right)(0.55\ \mathrm{kgkg^{-1}})$$
$$= 3.17\ \mathrm{kg\,m^{-3}\,h^{-1}}$$

$$D_{opt} = \mu_m\left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + S_o}}\right)$$

$$= 0.45\ h^{-1}\left(1 - \sqrt{\frac{0.8\ kg\ m^{-3}}{0.8\ kg\ m^{-3} + 20\ kg\ m^{-3}}}\right)$$

$$= 0.36\ h^{-1}$$

$$DX_{opt} = 0.36\ h^{-1}\ \frac{20\ kg\ m^{-3} - (0.8\ kg\ m^{-3})(0.36\ h^{-1})(0.55\ kg\ kg^{-1})}{(0.45\ h^{-1} - 0.36\ h^{-1})}$$

$$= 3.33\ kg\ m^{-3}\ h^{-1}$$

ดังนั้นปริมาณเซลล์ที่ได้ เมื่อมีการใช้กลูโคสไปร้อยละ 90 เท่ากับ $\frac{3.17 \times 100}{3.33}$ = 95% ตามทฤษฎี

**ตัวอย่างที่ 32** ถ้ากำหนดให้อัตราการเจริญจำเพาะที่มีการยับยั้งในการเพาะเลี้ยงแบบคีโมสเตต แสดงได้ดังนี้

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S + I K_S / K_i}$$

เมื่อ $S_o$ = 10 กรัมต่อลิตร $K_S$ = 1 กรัมต่อลิตร $I$ = 0.05 กรัมต่อลิตร

$Y_{X/S}$ = 0.1 กรัมต่อกรัม $X_o$ = 0 $K_i$ = 0.01 กรัมต่อลิตร

$\mu_m$ = 0.5 ต่อชั่วโมง

1. จงแสดงความสัมพันธ์ของเซลล์ และสับสเตรต ในเทอมของอัตราการเจือจาง ในสภาวะที่ไม่มีสารยับยั้ง
2. เมื่อการเพาะเลี้ยงดังกล่าวมีสารยับยั้งอยู่ด้วย จงแสดงความสัมพันธ์ของเซลล์และสับสเตรต ในเทอมของอัตราการเจือจาง
3. จงแสดงอัตราการผลิต (DX) ในเทอมของอัตราการเจือจาง

<u>วิธีทำ</u>

1.

$$S = \frac{K_S D}{\mu_m - D}$$

$$= \frac{D}{0.5 - D}$$

$$X = Y_{X/S}(S_o - S)$$

$$= 0.1\left(IO - \frac{D}{0.5 - D}\right)$$

2. ในกรณีที่มีสารยับยั้ง จะได้

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S(1 + I/K_i) + S} = D$$

$$S = \frac{K_S(1 + I/K_i) D}{\mu_m - D}$$

$$= \frac{(1 + (0.05/\ 0.01)\ D}{0.5 - D}$$

$$S = \frac{6\ D}{0.5 - D}$$

$$X = Y_{X/S}(S_o - S)$$

$$= 0.1\left(10 - \frac{6D}{0.5 - D}\right)$$

$$DX = D\,Y_{X/S}(S_o - S)$$

$$= 0.1\ D\left(IO - \frac{6\ D}{0.5\text{-}D}\right)$$

**การเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเบซท์กับการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง**

การเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเบซท์กับการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณสับสเตรตที่มีค่ามากกว่า $K_S$ โดยกำหนดให้อัตราการเจริญที่เกิดขึ้นมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

โดยที่ $$X = X_o \exp(\mu_m t)$$

หรือ $$t = \frac{1}{\mu_m} \ln (X/X_o)$$

เมื่อเวลาที่พิจารณาอยู่ในระยะเพิ่มจำนวนในการเพาะเลี้ยงแบบเบซท์ เวลาที่พิจารณาจะรวมตั้งแต่ระยะปรับตัวของเชื้อ ระยะเพิ่มจำนวน ระยะการเตรียมอาหารและอุปกรณ์ถังหมัก ซึ่งเรียกว่า turnaround time ($t_{turn}$) ดังนั้นเวลาทั้งหมดที่ใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเบซท์จึงแสดงได้ดังนี้

$$t_{batch} = \frac{1}{\mu_m} \ln (X/X_o) + t_{turn}$$

โดยอัตราการผลิตในการเพาะเลี้ยงแบบเบซท์

$$= \frac{Y_{X/S}\ S_o}{t_{batch}}$$

$$= \frac{Y_{X/S}\ S_o}{\frac{1}{\mu_m} \ln (X/X_o) + t_{turn}}$$

ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง อัตราการผลิตจะเท่ากับ

$$= \mu_m Y_{X/S}\ S_o$$