

บทที่ 10

การหมักและการให้อากาศในการหมัก

10.1 คำนำ

วิธีการอย่างง่ายที่สุดสำหรับการให้อากาศ (aeration) แก่เชื้อจุลินทรีย์คือการเพาะเลี้ยง เชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวของสื่อกลางอาหารเหลวที่อยู่นิ่งหรือบนสื่อกลางอาหารแข็ง วิธีการนี้ยังคงใช้กันอยู่โดยทั่วไปในหองปฏิบัติการและในการหมักทางอุตสาหกรรมแบบเก่าที่ต้องใช้อากาศ เช่น การผลิตน้ำส้มสายชูและกรดซิตริก เป็นต้น พื้นนิซิลลินเริ่มแรกก็ถูกผลิตโดยเชื้อรา Penicillium ที่เพาะเลี้ยงไว้บนผิวของสื่อกลางอาหาร แต่เนื่องจากความต้องการ พื้นนิซิลลินมีจำนวนมากขึ้นจึงกระตุ้นให้มีการศึกษาเกี่ยวกับการหมักโดยทำให้เชื้อจุลินทรีย์จมอยู่ในสื่อกลางอาหารเหลว (submerged culture) แล้วให้อากาศ และในไม่ช้าก็นำไปสู่การปรับปรุงหลักการขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับการให้อากาศแก่เชื้อจุลินทรีย์ซึ่งจมอยู่ในของเหลว

Kluyver และ Perquin (1933) ได้ปรับปรุงวิธีการเขย่าฟลาสก์เพื่อเพาะเลี้ยง เชื้อราที่จมอยู่ในของเหลว แต่มีอุปนิสัยชอบที่จะเจริญเติบโตบนพื้นผิวของซีบสเทรค การปรับปรุงกลวิธีการเขย่าฟลาสก์มีความสำคัญเป็นอย่างมากเนื่องจากช่วยให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเจริญเติบโตได้ด้วยความหนาแน่นสูงภายใต้สภาวะที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน และง่ายต่อการศึกษาด้านสรีรวิทยา (physiology) ของจุลินทรีย์อีกด้วย

ถังหมักที่มีการปั่นกวนหรือคนด้วยใบพัด (stirred fermenter) ในหองปฏิบัติการ ได้ถูกปรับปรุงให้มีความสามารถได้หลายอย่าง และมีสิ่งควบคุมครบถ้วนเพื่อการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์และเซลล์เนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ชั้นสูง ถังหมักแบบหมุน (rolling fermenter) ได้ถูกเสนอขึ้นเพื่อใช้แทนถังหมักที่มีการปั่นกวนหรือคนด้วยใบพัดในแง่เพื่อหลีกเลี่ยงการตัดเฉือนของใบพัดซึ่งได้เคยถูกกล่าวหาว่าก่อให้เกิดความเสียหายแก่เชื้อจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเส้นสายอาจถูกตัดเฉือนอย่างเห็นได้ชัดในบางโอกาสก็ไม่

หลักฐานแสดงให้เห็นชัดว่าการคักเฉือน (shear) นั้นเป็นอันตรายกการทำงานของ เชื้อจุลินทรีย์แม่แคเซลล์ส์คว์ เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งถือว่ามีโครงสร้างซึ่งบอบบางมากก็บังอาจเพาะเลี้ยงได้เป็นผลสำเร็จในถึงหมักที่มีการปั่นกววนหรือคนควยใบพัดควยอัตราความเร็วสูง (Klein et al., 1971) ชีวมวลที่ถูกคักเฉือนอาจไม่ไค้เป็นสาเหตุใหญ่ในการทำให้เกิดความเสียหายแก่อาจ เป็นเพียงช่วยเพิ่มให้ผลของอันตรายกอื่น เนื่องมาจากสื่อกลางอาหารเกินขีดขึ้น ในกรณีที่สูงจนไค้ว่าการคักเฉือนมีอันตรายกเชื้อจุลินทรีย์ถึงหมักแบบหมุนหรือสั่น อาจเหมาะสมที่จะนำมาใช้แทนถึงหมักที่มีการปั่นกววนหรือคนควยใบพัด เครื่องมือที่ทำให้เกิดการปั่นป่วนโดยการสั่นเขย่า (Ulrick & Moore, 1965) มีข้อไค้เปรียบกว่าคือไม่ตองใช้อุปกรณ์อุกปิตรงของระหว่างเชื้อเพลิงและเพลาหมุนซึ่งอาจนำไปสู่การทำไค้ปะปนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ตองการ เมื่ออุปกรณ์อุกปิตรงชำรุด

10.2 การปั่นกววนและการผสม

การปั่นกววนมีผลทำให้เกิดการปั่นป่วนแก่สื่อกลางการหมัก การปั่นป่วนของสื่อกลางการหมักมีหน้าที่สองประการคือ ช่วยในการถ่ายเทมวลระหว่างวัคภาคที่แตกต่ากัน (แกส ของเหลว และของแข็ง) ซึ่งปรากฏอยู่ในเชื้อจุลินทรีย์ และช่วยทำให้มีการผสมปนเปกนในเชื้อจุลินทรีย์เพื่อรักษาความเป็นอันหนึ่งอันเดียวกันของสภาวะแวดล้อมทางเคมีและฟิสิกส์ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างมากโดยเฉพาะต่อการกระจายชีวมวลเพื่อถ่ายเทความร้อนและการผสมปนเปกนกับซัสเตรคที่เติมเข้ามาใหม่อย่างค่อเนื่อง

ประสิทธิภาพของการผสมปนเปกนอาจถูกวัดไค้โดยจับเวลาที่ใช้เพื่อการกระจายสารละลายสีจำนวนเพียงเล็กน้อยที่เติมลงไปนของเหลวในถึงหมัก (Aiba et al., 1965, p173) การผสมปนเปกนอย่างสมบูรณ์อาจเกิดขึ้นไค้ยากเมื่อมีการเพิ่มขนาดของถึงหมัก การเพิ่มความข้นเหนียวหนืด (viscosity) ของเชื้อจุลินทรีย์และเมื่อมีการเติมซัสเตรคลงไปอย่างค่อเนื่อง ถ้าทำให้อัตราการไหลของสารละลายซัสเตรคลดลงก็จะทำให้การผสมปนเปกนอย่างสมบูรณ์เกิดขึ้นไค้ยากเช่นเดียวกัน ในกรณีหลังนี้ Hansford และ Humphrey (1966) ไค้ศึกษาพบว่าในการหมักแบบคงที่ทางเคมีในถึงหมักขนาด 5 ลิตรถ้าประสิทธิภาพในการผสม

ปน เปกนลคองจะทาใหพิชผลการ เจริญเติบโตของ ยีสต์ในการหมักซึ่ง ถูกกำหนดจากอัตราการ เจริญเติบโตควยน้ำตาลกลูโคสลดลงควยและผล เช่นนี้ จะเห็น โค้ชค้เมื่ออัตราความเร็วในการ เจริญ 0.03 h^{-1} ประสิทธิภาพในการผสมปน เปกนอาจถูกปรับปรุงให้ดีขึ้นได้โดย ใช้วิธีการเคมิซบสเตรคทีหลาย ๆ จุดแทนที่จะเป็นจุดเดียว

การปั่นป่วนมีผลต่อการถ่ายเทมวลจากแก๊สไปยังของเหลวในสามวิถีทางชั้น พื้นฐาน คือ (1) ช่วยกระจายแก๊สให้เป็นฟอง เล็กอง เพื่อเพิ่มพื้นผิวประชิค (2) ช่วยเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสระหว่างฟอง แก๊สกับของเหลว เนื่องจากการวนเวียนตกค้างอยู่ ของฟองแก๊สในของเหลวทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า "การยกสูงขึ้นโดยแก๊ส" (gas hold up) ซึ่งอาจกำหนดเป็นสมการโค้กนี้ ให้ $V_0 =$ ปริมาตรของเหลวซึ่งไม่มีแก๊ส $V =$ ปริมาตรของเหลวที่มีแก๊สกระจายอยู่ภายใน ดังนั้นปริมาตรที่ถูกยกขึ้น (hold up volume) คือ

$$V_H = V - V_0 \quad 10.1$$

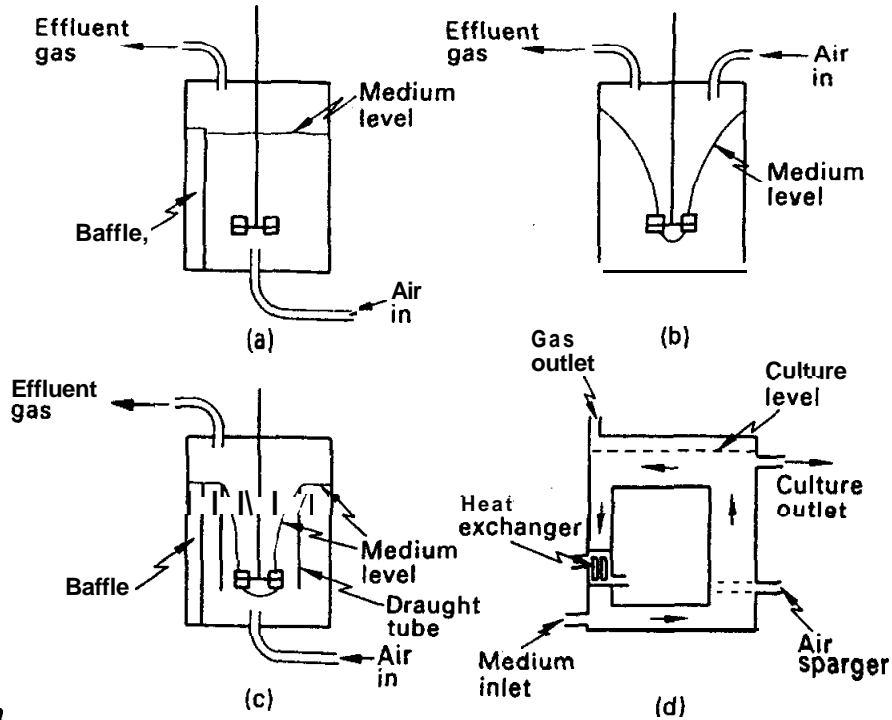
ช่วงระยะเวลาที่ฟองแก๊สตกค้างอยู่ในของเหลวหรือโค้สัมผัสกับของเหลวโดยเฉลี่ย (mean contact time) คือ V_H/F ซึ่ง F คืออัตราความเร็วในการไหลของแก๊ส การยกสูงขึ้นโดยแก๊สเป็นการเพิ่มพื้นผิวประชิคคองหนึ่งหน่วยปริมาตรของเหลวและการเปลี่ยนแปลงของ ปริมาตรที่ยกสูงขึ้นจะเปลี่ยนแปลงอัตราการรับถ่ายเทออกซิเจนจากแก๊สเช่นเดียวกัน (3) ความโกลาหล (turbulence) ที่เพิ่มขึ้นจากการทำให้ปั่นป่วนจะช่วยลดความหนาของแผ่นเยื่อเน็งรอบฟองแก๊สและช่วยเพิ่มค่าของ K_L ดังแสดงในคองที่ 9.6.1

10.3 วิธีการให้อากาศและวิธีการทำให้ปั่นป่วน

10.3.1 ควยระบบปะทะแผ่นครีบบและระบบหมุนวนเป็นกรวย

การทำให้ปั่นป่วนในถังหมักที่มีการปั่นกววนหรือคนควยใบพัดอาจเป็นอิสระหรือถูกปะทะไว้ควยแผ่นครีบบ (baffle) ที่ค้คองอยู่ตามคานข้างของถังหมักค้รูปที่ 10.1 แผ่นครีบบปะทะช่วยบองกันการหมุนวนเป็นกรวยลคองไป (vortex) และช่วยเพิ่มความโกลาหลในของเหลวให้มลคองยิ่งขึ้น การให้อากาศในระบบปะทะแผ่นครีบบอากาศจะคองถูกเป่าเข้า

ใบที่โตของเหลว ในระบบหมุนวนเป็นกรวยลึกลงไปอากาศจะถูกนำเข้าไปโดยกรวยของเหลวที่เกิดขึ้นแล้วถูกทำให้กระจายไปในของเหลวด้วยใบพัด ความโกลาหลจะเกิดขึ้นเป็นอย่างมากตรงบริเวณที่ใกล้ใบพัดแต่ที่อยู่ห่างออกไปจากใบพัดของเหลวจะหมุนวนด้วย ความโกลาหลเพียงเล็กน้อย



รูปที่ 10.1 Diagrammatic representations of agitation-aeration systems in stirred fermenters: (a) baffled system; (b) vortex system; (c) baffled system with draught tube; (d) I.C.I. 'pressure cycle' fermenter in which the culture circulates round the vessel in the direction of the arrows (Gow *et al.*, 1973).

ดูเหมือนว่าความโกลาหลสามารถถูกทำให้เกิดขึ้นได้อย่างเต็มที่โดยใช้แผ่นครีบปะทะสี่อันทางเท่า ๆ กันรอบถังหมัก ครีบปะทะแต่ละอันกว้าง 0.08 ถึง 0.1 ของเส้นผ่าศูนย์กลางของถังหมักและยาวตลอดความลึกของของเหลว (Finn, 1954)

10.3.2 ถ้วยระบบปะทะแผ่นครีบผสมระบบหมุนวนเป็นกรวย

ปลอกกลาง (draught tube) ที่ใช้ในถังหมักแบบ Waldhof ก็จากรูปที่ 10.1 (c) ก็ถูกปรับปรุงขึ้นเพื่อผลิตปีสค์ในประเทศเยอรมันระหว่างสงครามโลกครั้งที่สองทำให้เกิด

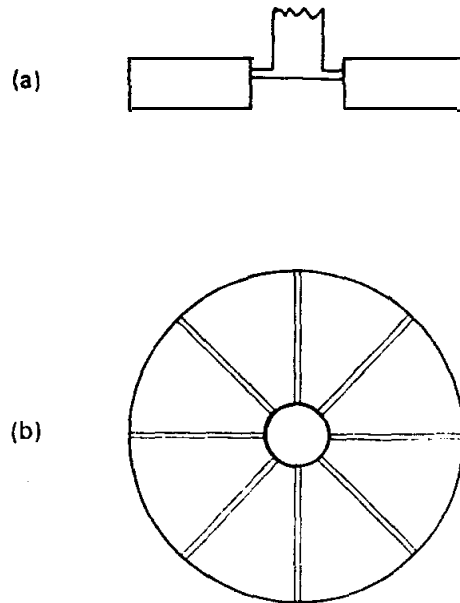
การหมุนวน เป็นกรวยลึกลงไปเฉพาะตรงกลาง แยกจากส่วนที่ถูกปะทะกับแผ่นครีบซึ่งอยู่รอบนอก Chain และคณะ (1952 , p. 94) ได้ศึกษาพบว่าถังหมักแบบ Waldhof มีพฤติกรรมคล้ายระบบหมุนวนเป็นกรวยลึกลงไปอย่างธรรมดาในถังหมักขนาด 5 ลิตร ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจเพื่อพิจารณาว่าข้อสรุปนี้ยังคงใช้ไ้หรือไม่เมื่อทำให้ถังหมักในระบบนี้มีขนาดใหญ่ขึ้น

10.3.3 ควยระบบยกสูงขึ้นควยอากาศ

สถาบัน Imperial Chemical Industries (I.C.I) ได้ปรับปรุงวิธีการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) จากการหมักเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในเมทานอล ได้เสนอหลักการเกี่ยวกับการยกสูงขึ้นควยอากาศ (air lift) เพื่อการให้อากาศและการผสมปนเปกันในถังหมักขนาดใหญ่ ดังรูปที่ 10.1 d ระบบนี้มีข้อได้เปรียบคือใช้กลไกซึ่งง่ายมากกว่าถังหมักที่มีการปั่นกวนหรือคน ค่า K_{La} ที่ได้รับจากระบบนี้อาจคำนวณได้จากสมการที่ 9.22 สำหรับขบวนการที่ใช้เมทานอลเป็นซับสเตรตถ้าถือว่า $Y_{x/10} \approx 0.44$ ดังตารางที่ 8.2 $\mu = 0.2 \text{ h}^{-1}$, $x = 20 \text{ g/l}$, $c_s = 18 \times 10^{-3} \text{ g/l}$ จากการให้อากาศที่ความกดตัน 3 บรรยากาศ และค่าเฉลี่ยของ $c = 9 \times 10^{-3} \text{ g/l}$ จะได้ค่า K_{La} ประมาณ 1000 h^{-1} ซึ่งก็อยู่ในระดับเดียวกันกับที่ได้รับจากถังหมักที่มีการปั่นกวนหรือคนควยใบพัด

10.4 การออกแบบใบพัดกวน

ใบพัดกวน (impeller) แบบที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือแบบที่มีกลีบตั้งตรง ติดอยู่กับจาน (vaned disc) หรือที่เรียกในที่นี้ว่าใบพัดกลีบตั้ง ดังรูปที่ 10.2 เส้นผ่าศูนย์กลางที่เหมาะสมของใบพัดแบบนี้คือประมาณ 0.4 ของเส้นผ่าศูนย์กลางของถังหมัก ใบพัดกลีบตั้งทำให้ของเหลวไหลหนีออกจากแกนกลางควยแรงเหวี่ยง (centrifugal flow) แตกต่างไปจากการไหลตามแกน (axial flow) ซึ่งใช้ใบพัดกลีบเฉียง จากอัตราการออกซิเคชั่นของซิลฟิค์แสดงให้เห็นว่าถ้าใช้กับระบบหมุนวนเป็นกรวยควยใบพัดกวนที่ 1000 รอบต่อนาทีขึ้นไปจะมีความแตกต่างกันน้อยมาก แต่อัตราความเร็วในการปั่นกวนตามปกติของระบบหมุนวนเป็นกรวยจะอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่า 1500 รอบต่อนาที ดังนั้นจึงเหมาะที่จะใช้ใบพัดกลีบตั้ง



รูปที่ 10.2 Vaned disc impeller. (a) Elevation of impeller as fitted for baffled system with main depth of blade below the disc. When used in the vortex system the impeller is fitted in the reverse way; (b) plan showing eight vanes.

ด้วยอัตราความเร็วในการปั่นกววนซึ่ง เท่ากันอัตราการละลายของออกซิเจน ที่ได้รับจากใบพัดกลีบตั้งจะเหมือนกันไม่ว่าใบพัดจะถูกติดตั้งไว้ที่ครึ่งหนึ่งของความลึกของของเหลวหรือสูงกว่าที่ก้นของถังหมักเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามสำหรับระบบหมุนวน เป็นกรวยใบพัดที่ติดตั้งสูงจะใช้กำลังน้อยกว่า(Chain et al., 1952 p.84) และยิ่งถ้า ใบพัดวางถูกติดตั้งให้ใกล้กับฐานหรือก้นของถังหมักมากเกินไปจะเกิดเป็นจวนซึ่งมากเกินไป เนื่องจากฐานหรือก้นของถังหมักทำหน้าที่เป็นจวนไปพร้อมกันด้วย

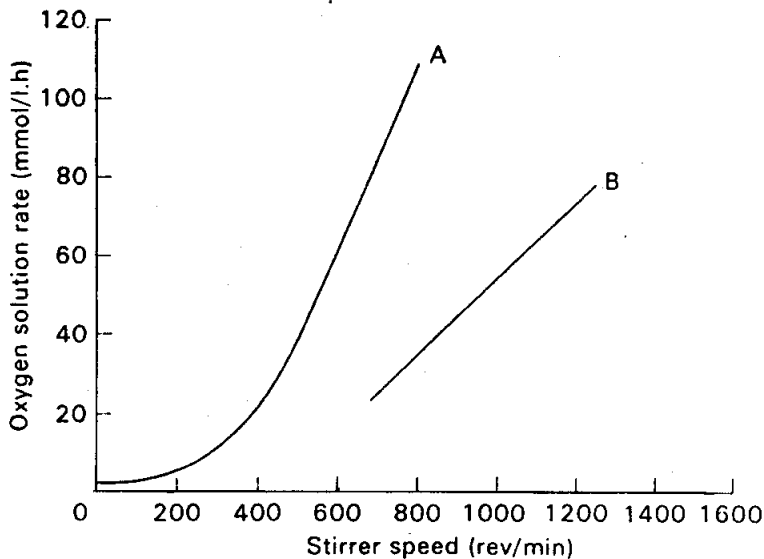
ในระบบหมุนวนเป็นกรวยอัตราการละลายของออกซิเจนที่ได้รับจากใบพัดที่มีกลีบแปดกลีบตั้งคิกกับจวนจะเป็นหลายเท่ากว่าใบพัดที่มีกลีบสี่กลีบ แต่ไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างใบพัด 8 และ 16 กลีบ(Chain et al., 1952 p.90) ดังนั้นจำนวนกลีบใบพัดที่เหมาะสมจึงควรเป็นแปดกลีบ

ความสูงที่เหมาะสมของกลีบใบพัดแบบกลีบตั้งควรเป็นประมาณ 1/6 ของเส้นผ่าศูนย์กลางใบพัด (Chain et al., 1952 p.89; Finn, 1954)

สำหรับระบบหมุนวนเป็นกรวยต้องการใช้ใบพัดกวนเพียงอันเดียวแต่สำหรับระบบปะทะแผ่นครีบบนท้องปฏิบัติการ Chain และคณะ (1952, p. 82) พบว่าอัตราการออกซิเจนของซิลไฟต์ไมไค้เพิ่มมากขึ้นเมื่อใส่ใบพัดจำนวนมากติดกันแกนเป็นราวเดียวกันที่ตำแหน่งความสูงต่าง ๆ กันแต่กลับเพิ่มการใช้กำลังให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้ใบพัดกวนหลายอันช่วยให้มีการผสมปนเปกันได้ดียิ่งขึ้น ในกรณีของระบบปะทะแผ่นครีบนานาใหญ่ โดยเฉพาะที่ใช้กับสื่อกลางอาหารที่เปลี่ยนแปลงความหนืดหนืดได้แก่ที่อุณหภูมิคงที่ (Non-Newtonian viscosity) ก็อาจต้องการใบพัดกวนหลายอัน

10.5 ผลของอัตราความเร็วในการปั่นกวน

อัตราความเร็วในการปั่นกวนมีผลต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในระบบการให้อากาศแบบหมุนวนเป็นกรวยและแบบปะทะแผ่นครีบบังแสดงในรูปที่ 10.3



รูปที่ 10.3 Effect of stirrer rate on oxygen solution rate in baffled and vortex aeration systems with the same vaned disc impeller in a laboratory fermenter (based on data from Chain & Gualandi, 1954). Line A, baffled system; line B, vortex system.

ในระบบปะทะแผ่นครีป K_{La} มีค่าอย่างหนาบเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อ N^3 ซึ่ง N คืออัตราการเร็วของใบพัดกวนเป็นรอบต่อนาที (Chain & Gualandi, 1954) ในระบบหมุนวนเป็นกรวยอัตราการละลายของออกซิเจนจะเริ่มสูงขึ้นเมื่ออัตราการเร็วในการปั่นกวนสูงถึงระดับหนึ่ง เสียก่อนแล้วหลังจากนั้นจึงจะเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงสัมพันธ์กับอัตราการเร็วในการปั่นกวน

10.6 ผลจากการเป่าอากาศเข้าไปในถังหมัก

ผลของการเป่าอากาศเข้าไปในถังหมักด้วยอัตราการเร็วที่แตกต่างกันในระบบปะทะแผ่นครีปและระบบหมุนวนเป็นกรวยทั้งแสดงในรูปที่ 10.4 และ 10.5 รูปที่ 10.4 แสดงว่าอัตราการละลายของออกซิเจนในระบบปะทะแผ่นครีปจะเพิ่มเข้าใกล้ถึงจุดสูงสุดเมื่ออัตราการไหลของอากาศถูกทำให้เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ทั้งนี้จึงอาจไม่เพียงพอที่จะเพิ่มอัตราการไหลของอากาศเพื่อเพิ่มอัตราการละลายของออกซิเจนเมื่อใกล้ถึงจุดสูงสุด แต่ผลของ Chain และ Gualandi (1954, p.48) พบว่าการเป่าอากาศเข้าไปที่ใกล้กับใบพัดกวนในระบบหมุนวนเป็นกรวยสามารถช่วยเพิ่มอัตราการละลายของออกซิเจนได้เป็นหลายเท่าโดยไม่จำกัด ผลเช่นนี้ได้รับการยืนยันจาก Callow และ Pirt (1961) ทั้งแสดงในรูปที่ 10.5

ในระบบปะทะแผ่นครีปไม่มีความแตกต่างระหว่างอัตราการละลายของออกซิเจนที่ได้รับจากรูเป่าอากาศเพียงรูเดียวและที่ได้รับจากรูเป่าอากาศหลายรู (Chain et al., 1952, p.78) ในถังหมักขนาดเล็กปกติมักใช้รูเป่าอากาศเพียงรูเดียว เส้นผ่าศูนย์กลางของรูเป่าอากาศที่เหมาะสมคือประมาณ 1 ถึง 3 มม.

เครื่องคินเดาและเหล็กไม่เป็นสนิมหรือแก้วที่มีรูพรุนขนาดเล็กช่วยทำให้อัตราการละลายของออกซิเจนในระบบที่ไม่มีกวนหรือคนสูงกว่าเป็นหลายเท่าของการเป่าอากาศด้วยรูเดียวขนาดใหญ่ การเป่าอากาศด้วยรูพรุนมีประโยชน์ต่อการให้อากาศแบบไม่ต้องมีการปั่นกวนหรือคนแต่มีข้อเสียคือรูมักจะถูกอุดตันด้วยวัสดุโดยเฉพาะเชื้อราที่เป็นเส้นสาย

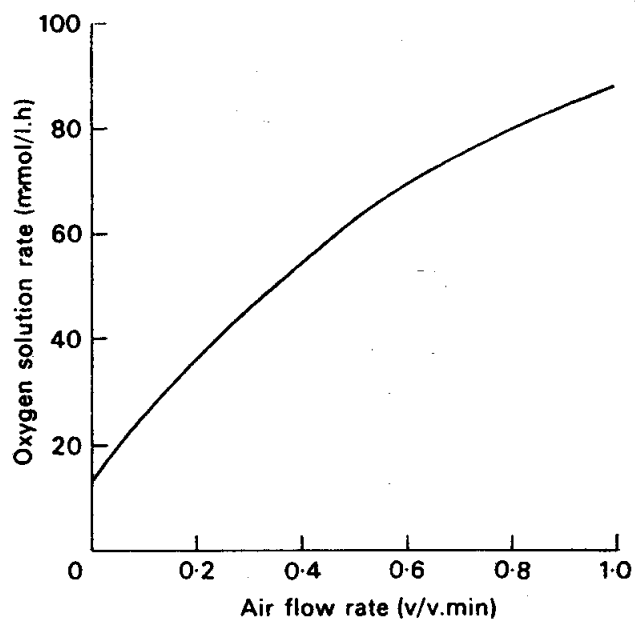


Fig 10.4 Effect of air sparging on oxygen solution rate in a baffled stirred fermenter; v/v.min = volumes of air/volume liquid \times minute (Chain *et al.*, 1952).

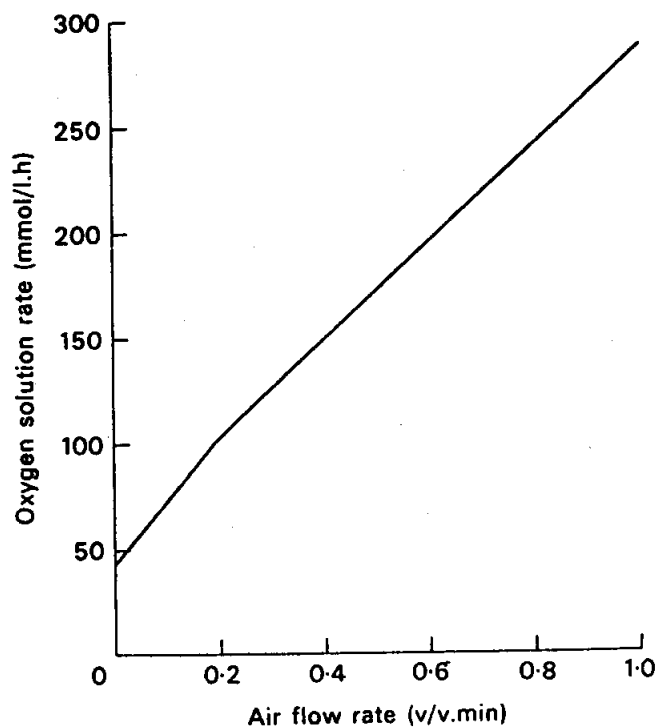


Fig 10.5 Effect of air sparging on oxygen absorption rate of sulphite solution (copper catalyst) in vortex system (redrawn from Pirt & Callow, 1961). Single orifice sparger; vaned disc impeller, diameter 102 mm in vessel of 228 mm diameter; liquid volume, 12 l.

10.7 ผลจากอุณหภูมิต่อความเหนียวหนืด

การถ่ายเทออกซิเจนในสื่อกลางที่เป็นน้ำค่าของ $K_L a \propto T^{1/2}$ ซึ่ง T คืออุณหภูมิเป็นองศาสมบูรณ์ (Aiba et al., 1965p.151) จึงหมายความว่าที่อุณหภูมิประมาณ 30°C ค่า $K_L a$ เพิ่มขึ้นประมาณ 13% ต่อ 10 องศาของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น

O'Connor อ้างโดย Aiba et al., 1965, p.151) เสนอว่า $K_L a \propto (1/\eta)^{1/2}$ ซึ่ง η คือความเหนียวหนืด (viscosity) ของสื่อกลาง Hattori และคณะ (1972) ได้ศึกษาถึงผลของการเพิ่มความเหนียวหนืดโดยเติม carboxymethylcellulose ลงไปในสื่อกลาง พบว่า $K_L a \propto \eta^{-0.35}$ เมื่อ $\eta < 50$ cP และ $K_L a \propto \eta^{-1.1}$ เมื่อ $\eta > 50$ cP ดังนั้น 50 cP จึงเป็นความเหนียวหนืดวิกฤต (critical viscosity) ที่แสดงผลออกมามากที่สุด

10.8 ผลจากปัจจัยที่กระทำต่อผิวและผลจากไฮโดรคาร์บอน

ในสื่อกลางการหมักและผลผลิตของ เชื้อจุลินทรีย์มักมีปัจจัยที่กระทำต่อผิว (surface active agent) เกิดขึ้น การเกิดฟองเป็นหลักฐานที่บ่งชี้ว่ามีปัจจัยเหล่านี้ อยู่ ปัจจัยที่กระทำต่อผิวมีผลต่อค่า $K_L a$ อย่างที่ไม่อาจจะทำนายได้ Aiba และคณะ (1965, p.153) ได้จัดทำให้เป็นระบบเพื่อการสังเกตและได้รายงานว่า sodium lauryl sulphate (10 mg/l) ลดทั้ง K_L และ $K_L a$ ลงมาถึงประมาณ 50% แต่เมื่อใช้สารทำความสะอาด (detergent) นี้จำนวนมากขึ้นก็จะทำให้ค่า $K_L a$ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ค่า K_L ยังคงคงที่ ผลเช่นนี้อาจเนื่องจากสารทำความสะอาดทำให้ฟองมีขนาดเล็กลง เหตุผลที่สารทำความสะอาดที่ความเข้มข้นต่ำลดค่าของ $K_L a$ ลงนั้นยังไม่อาจจะอธิบายได้

Chain และ Gualandi (1954, p.42) รายงานว่าฟองที่เกิดขึ้นโดยสิ่งที่ยังไม่ทราบแน่ชัดในระบบการให้อากาศแบบหมุนวนเป็นกรวยลดอัตราการละลายของออกซิเจนลงถึง 1/10 ของค่าปกติ การทำให้ฟองสลายตัวด้วยสารสลายฟอง (antifoam agent) จะทำให้อัตราการละลายของออกซิเจนกลับคืนสู่ค่าปกติ ดูเหมือนจะมีปัญหาว่า ฟองที่เกิดขึ้นในระบบหมุนวนเป็นกรวยนำพาออกซิเจนออกจากระบบและกีดกันอากาศใหม่

ที่จะเข้าไป สารละลายฟองโคถูกรายงานว่าลดค่า K_{La} อย่างเห็นได้ชัดเนื่องจากเพิ่มขนาดของฟองอากาศ(Phillips & Johnson, 1961)

การเติม kerosene ลงในพลาสติกเซย์โก้เคยถูกรายงานว่าเพิ่มค่า K_{La} อย่างน่าสนใจ(Mimura et al., 1969) kerosene จำนวนมาก (>10% ของปริมาตรสื่อกลางที่เป็นน้ำ) มีความจำเป็นต่อการทำให้เกิดผลกึ่งถาวรซึ่งยังไม่อาจจะอธิบายได้ อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปออกซิเจนละลายในน้ำมันโคก็จะเป็น 100 เท่าของน้ำจึงอาจถือได้ว่า kerosene ทำหน้าที่เป็นตัวนำพาออกซิเจน

10.9 ผลของชีวมวล

ไมซีเลียมของเชื้อราในสื่อกลางการหมักสามารถลดค่า K_{La} ได้อย่างรุนแรง ไมซีเลียมของ Penicillium จำนวน 20 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตรทำให้ค่า K_{La} ลดลงได้ประมาณ 40 ถึง 50% (Chain & Gualandi, 1954, p.43) และไมซีเลียมของ Aspergillus จำนวน 20 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตรลดค่า K_{La} ได้ถึง 90% (Brierly & Steel, 1959) นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองใช้เยื่อกระดาษกระตุ้นให้เกิดผลเช่นเดียวกับไมซีเลียมได้อีกด้วย ความเหนียวหนืดที่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายเมื่ออุณหภูมิสูงที่ (high non-Newtonian viscosity) โดยสาเหตุของไมซีเลียมอาจถือได้ว่ามีผลต่อค่า K_{La} เป็นอย่างมาก

10.10 ความต้องการกำลังงานเพื่อการปั่นกววน

ค่า K_{La} เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อกำลังงานที่ใส่เข้าไปต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์(Finn, 1954 ; Chain & Gualandi, 1954) สำหรับระบบที่มีความไกลาผลอย่างสมบูรณ์แบบควายไบพคกิลิมทั้งอาจเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$K_{La}H \approx \alpha P/V$$

10.2

ซึ่ง P = กำลังงานที่ให้ , V = ปริมาตรของเหลว , H = ค่าคงที่ของ Henry และ α คือค่าคงที่เรียกว่าอัตราส่วนกำลังงาน Chain และ Gualandi (1954) พบว่า α มีค่า

สูงสุดเป็น 138 mmol oxygen/h. watt. atm oxygen ในระบบหมุนวนเป็นกรวยขนาด 5 ลิตร อย่างไรก็ตามอัตราส่วนกำลังงานจะลดลงอย่างน่าพิสง เมื่อเพิ่มขนาดของถังหมัก ในระบบหมุนวนเป็นกรวยเช่น ในถังหมักขนาด 2000 ลิตรจะเหลือเพียงประมาณ 0.138 เท่านั้น ส่วนในระบบปะทะแผ่นครีบที่มีความไกลาหลอย่างเต็มที่ ≈ 100 และสามารถถูกรักษาไว้ได้ในปริมาตรของเหลวที่อยู่ในช่วงตั้งแต่ 5 ถึง 10000 ลิตร จึงอาจกล่าวได้ว่าในระบบการให้อากาศแบบหมุนวนเป็นกรวยมีประสิทธิภาพสูงเฉพาะในถังหมักขนาดเล็กเท่านั้นที่จะไม่รับผลกระทบเมื่อถูกทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น (scale up) ต่างจากระบบการปะทะแผ่นครีบ

10.11 การเกิดฟองและการควบคุมฟอง

การเกิดฟองที่คงทนเป็นลักษณะซึ่งไม่ต้องการของการให้อากาศในสื่อกลางการหมักที่มีสารอินทรีย์ต่าง ๆ ปะปนอยู่ สิ่งซึ่งทำให้ฟองคงทน (foam stabilizer) มักปรากฏอยู่ในสื่อกลางอาหารหมักหรือถูกผลิตขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์เป็นสารที่ไม่อาจกำหนดได้ว่าเป็นสารชนิดใด และการควบคุมฟองที่เกิดขึ้นจะต้องอาศัยความชัดเจนจากงานการทดลองอย่างแท้จริง ผลเสียหายจากการเกิดฟองมีได้ดังต่อไปนี้คือ (1) ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถถูกส่งออกไปจากถังหมักได้โดยพองทางของอากาศ (2) ฟองอาจลดค่า $K_L a$ ได้ดังกล่าวมาแล้วในตอนที่ 10.8 (3) ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีฟองทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในปริมาณที่ถูกยกสูงขึ้นโดยแก๊ส ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถควบคุมปริมาตรของเหลวในถังหมักได้

โดยปกติอาจป้องกันการเกิดฟองได้โดยใช้สารต้านฟอง (antifoam agent) การตีฟองให้แตกสลายโดยวิธีทางกลไก (mechanical foam breaker) ได้เคยถูกแนะนำให้ใช้แต่ประสิทธิภาพในทางปฏิบัตินั้นยังไม่แน่นอนและยังต้องประสบกับปัญหาเกี่ยวกับความซับซ้อนของกลไกอีกด้วย การศึกษาเกี่ยวกับปริมาณสารต้านฟองที่ต้องใช้เพื่อยับยั้งฟองได้เคยถูกรายงานโดย Ghosh และ Pirt (1954) และ Pirt และ Callow (1958 b) สารต้านฟองหลายชนิดที่เคยใช้มักมีส่วนประกอบไม่แน่นอน Polypropylene glycol

(น.น.โมเลกุล 2000) เป็นสารต้านฟองที่มีประสิทธิภาพสูงมากและเจือยธาทางชีววิทยา อย่างไรก็ตามทั้ง ๆ ที่เติมสารต้านฟองบางกรณีฟองก็อาจเกิดขึ้นจนไม่สามารถควบคุมได้ เว้นแต่จะลดอัตราการไหลของอากาศที่เป่าเข้าไปในเชื้อจุลินทรีย์

10.12 ระบบการปั่นกววนและให้อากาศสำหรับถังหมักในห้องปฏิบัติการ

ถังหมักที่มีการปั่นกววนหรือคนในห้องปฏิบัติการซึ่งมีขนาดความจุในช่วงประมาณ 0.1 ถึง 10 ลิตร การปั่นกววนและการให้อากาศโดยใช้ระบบหมุนวนเป็นกรวยจะสะดวกกว่าระบบปะทะแผ่นครีมนื่องจากไม่ตองใช้แผ่นครีมนปะทะและท่อเป่าอากาศ ในระบบหมุนวนเป็นกรวยอาจทำให้มีค่า $K_L a$ สูงขึ้นได้โดยใส่หัว เป่าอากาศหนึ่งรูลงไปที่ใต้หรือข้างใบพัดกววน การไม่ใช้แผ่นครีมนปะทะมีประโยชน์โดยเจเพาะต่อกรหมักแบบต่อเนื่อง เป็นระยะเวลายาวนาน เนื่องจากชีวมวลมักจะมีการรวมตัวกันติดอยู่กับแผ่นครีมนปะทะ ข้อดีอีกอย่างหนึ่งของระบบหมุนวนเป็นกรวยคือทำให้เกิดฟองนอยกวาระบบปะทะแผ่นครีมน ดังหมักแบบมีแผ่นครีมนปะทะเหมาะสำหรับศึกษาเป็นโรงงานนำร่อง (pilot plant) ขนาดใหญ่เมื่อการให้อากาศแบบหมุนวนเป็นกรวยมีประสิทธิภาพนอยลง สำหรับเชื้อราที่เป็นเส้นสายในถังหมักที่มีอุปกรณ์ครบถ้วนโดยเฉพาะเมื่อต้องการหมักแบบคงที่ทาง เคมีมักใช้ถังหมักที่มีขนาดเล็กมากที่สุดเท่าที่จะทำได้เช่นประมาณ 1.5 ลิตรโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 ซม. เพื่อไม่ให้เชื้อรามีการเกาะรวมตัวกันตามทงอุปกรณ์เครื่องวัดต่าง ๆ ทำให้ไม่สามารถรักษาความเป็นอันหนึ่งอันเดียวกันของ เชื้อจุลินทรีย์ไว้ได้

10.13 การให้อากาศโดยใช้ฟลาสค์เขย่า

ฟลาสค์เขย่าโดยทั่วไปเป็นภาชนะอย่างง่ายสำหรับการปั่นกววนเชื้อจุลินทรีย์ในของเหลวแบบเก็บกัก กลวิธีนี้ได้ถูกปรับปรุงขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Kluyver และ Perquin (1933) ตั้งแต่นั้นมาจึงได้นำมาใช้กับเชื้อจุลินทรีย์ทุกประเภทของโปรทีสค์และเซลล์เนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ชั้นสูง

เครื่องเขย่าแบบหมุนวน (rotary shaker) โยบทั่วไปมักนิยมใช้มากกว่าแบบย้อนกลับไปมา (reciprocating shaker) เนื่องจากการเขย่าแบบหมุนวนไม่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์กระเด็นหรือถูกโยนออกมาและไม่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เกาะติดกับผนังที่อยู่เหนือระดับของเหลวจึงเหมาะที่จะใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราที่เป็นเส้นสายและจุลินทรีย์ต่าง ๆ การทายนึ่งภายในของพลาสติกควยชนิดโคนอาจช่วยป้องกันการเกาะติดของชีวมวลตามผนังได้เป็นอย่างดี

ทั้งเครื่องเขย่าแบบย้อนกลับไปมาและแบบหมุนวนปกติมักมีระยะทางในการโยกโยนอยู่ในช่วงระหว่าง 25 ถึง 50 มม. ซึ่งก็คือระยะห่างที่สุดซึ่งพลาสติกจะเคลื่อนที่ออกจากจุดหนึ่งแล้วเคลื่อนที่กลับคืนมา การเขย่าแบบกลับไปมาปกติจะใช้ความเร็ว 100 รอบ/นาที แต่การเขย่าแบบหมุนวนปกติมักใช้ความเร็วอยู่ในช่วง 150 ถึง 300 รอบ/นาที

10.14 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการละลายของออกซิเจนในพลาสติกเขย่า

10.14.1 ผลจากรูปร่างของพลาสติก

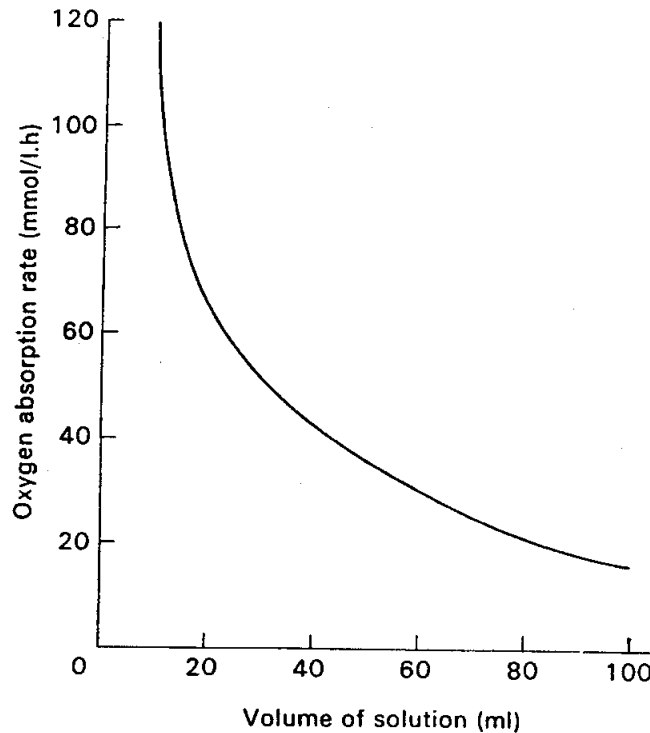
Chain และ Gualandi (1954, p. 33) พบว่าการเขย่าแบบหมุนวนไม่มีความแตกต่างระหว่างอัตราการละลายของออกซิเจนในพลาสติกก้นกลมกับพลาสติกรูปกรวยที่มีขนาดบรรจุของเหลวและปริมาตรเท่ากันแต่การเขย่าแบบย้อนกลับไปมาอัตราการละลายของออกซิเจนในพลาสติกรูปกรวยจะมากกว่าในพลาสติกก้นกลมหลายเท่า

การใส่ครีмпปะทะลงในพลาสติกเขย่าแบบหมุนวนอาจช่วยเพิ่มอัตราการละลายของออกซิเจนได้ถึงสิบหรือมากกว่าสิบเท่า (Chain & Gualandi, 1954, p. 37) ครีмпปะทะที่มีประสิทธิภาพจะแบ่งก้นพลาสติกออกเป็นสี่ช่องเท่า ๆ กันและแต่ละช่องมีความลึกเพียงไม่กี่มิลลิเมตร นอกจากนี้เหรียญที่ทำด้วยเหล็กไม่เป็นสนิมก็มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกันแต่มีข้อได้เปรียบกว่าคือสามารถเอาออกจากพลาสติกได้เมื่อต้องการ (Jensen et al., 1963) บทบาทสำคัญอย่างอื่นของครีмпปะทะคือช่วยกระจายซัสเพนเดนต์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำเช่นไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ ลักษณะที่ไม่ต้องการของการเขย่าแบบคิกครีмпปะทะคือการกระเด็น

ซึ่งชักนำไปให้เชื่อว่าที่เป็น เส้นสายเกาะคึกกับผนังของพลาสติกเหนื่อสีกลางอาหาร เหลว

10.14.2 ผลจากปริมาตรของเหลว

อัตราการละลายของออกซิเจนทั้งจากการเขย่าแบบหมุนวนและแบบย้อนกลับ ไปมาจะตกลงเป็นอย่างมากถ้าเพิ่มปริมาตรของเหลว จากการทดลองของ Smith และ Johnson (1954) โคนี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการละลายของออกซิเจน กับปริมาตรของเหลวในพลาสติกเป็นเส้นกราฟดังแสดงในรูปที่ 10.6



รูปที่ 10.6 Effect of liquid volume on oxygen absorption rate of sulphite solution (copper catalyst) in a shake flask from data of Smith & Johnson (1954): flask capacity, 500 ml; rotary shaking at 250 rev/min; throw, 50 mm.

10.14.3 ผลจากความเร็วในการเขย่าและระยะทางในการโยกโยน

อัตราการละลายของออกซิเจนในพลาสติกเขย่าจะเพิ่มขึ้นมากกว่าการเพิ่มเป็นเส้นตรงตามการเพิ่มขึ้นของความเร็วในการเขย่าหรือระยะทางในการโยกโยนอย่างใดอย่างหนึ่ง Chain และ Gualandi (1954, p. 34) พบว่าถ้าใส่ของเหลวลงในพลาสติก

เป็นจำนวน 1/10 ของปริมาตรบรรจุแล้วเพิ่มความเร็วในการเขย่าแบบหมุนวนจาก 150 ถึง 300 รอบ/นาทีที่คว่ำระยะทางในการโยกโยนเท่ากับ 50 มิลลิเมตรจะเพิ่มอัตราการละลายของออกซิเจนขึ้นถึง 2.5 เท่า การลดระยะทางในการโยกจาก 50 เป็น 32 มิลลิเมตรจะลดอัตราการละลายของออกซิเจนคว่ำปัจจัย 0.5

10.14.4 ผลของชีวมวล

Chain และ Gualandi (1954 , p. 35) พบว่าถ้าเพิ่มน้ำหนักโมซีเลียมแห้งของ Penicillium สูงถึง 20 กรัม/ลิตรอัตราการละลายสูงสุดของออกซิเจนจะลดลงเกือบเป็นเส้นตรงสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้งโมซีเลียมที่เพิ่มขึ้น การลดลงทั้งหมดจะเป็นประมาณ 90% จึงแสดงว่าชีวมวลสามารถลดอัตราการดูดซับออกซิเจนในพลาสติกเขย่าอย่างเห็นได้ชัด

10.14.5 อัตราการแพร่กระจายของแก๊สผ่านจุกสำลี

พลาสติกเขย่าปกคิมักถูกอุดด้วยจุกสำลีซึ่งเป็นเครื่องกีดขวางการแพร่กระจายของแก๊สที่จะเข้าหรือออกจากพลาสติก Schultz (1964) ได้แสดงให้เห็นว่าอัตราการแพร่กระจายของออกซิเจนเข้าไปในพลาสติก (R_a , mmol/h) ถูกกำหนดได้โดยสมการ

$$R_a = \frac{3600 D_a A}{22.4 L} (p_o - p_i) \quad 10.3$$

ซึ่ง p_i และ p_o คือส่วนความดัน (atm) ของออกซิเจนในและนอกพลาสติกตามลำดับ A = พื้นที่หน้าตัด (cm^2) ของจุกสำลี L = ความยาว (cm) ของจุกสำลี D_a = ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (cm^2/sec) เมื่อวัดอัตราการแพร่กระจายของออกซิเจนจากการทดลองด้วยออกซิเจนอีเล็กโตรด Schultz พบว่าจุกสำลีธรรมดาที่มีความหนาแน่น 0.05 ถึง 0.08 g/cm^3 มีค่า $D_a \approx 0.19 \text{ cm}^2/\text{sec}$ จึงประมาณได้เท่ากับ 90% ของอัตราการแพร่กระจายอิสระ ทั้งนี้จุกสำลีจึงมีความต้านทานเพียงเล็กน้อยต่อการแพร่กระจายของแก๊สสมการโดยทั่วไปสำหรับอัตราการละลายของออกซิเจนในพลาสติกเขย่า (R_s , mmol/h) ถูกกำหนดโดยสมการ (Schultz, 1964)

$$R_s = \left[\frac{22.4 L}{3600 D_a A} + \frac{1}{K_L a H V_L} \right]^{-1} (p_o - p_i) \quad 10.4$$

ซึ่ง $K_L a =$ สัมประสิทธิ์การถ่ายเทแก๊สไปยังของเหลว (h^{-1}) $H =$ ค่าคงที่ของ Henry สำหรับแก๊สออกซิเจน ($mmol\ ml^{-1}\ atm^{-1}$) $V_L =$ ปริมาตรของเหลว (ml) $p_i =$ ความเค็ยคออกซิเจนที่ละลายในของเหลว (atm)

เมื่อใช้สมการที่ 10.3 กับพลาสติกรูปทรงที่มีจุดสำคัญขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 31 มม. และยาว 35 มม. พบว่าเมื่อ $p_i = 0$ และอากาศภายนอกพลาสติกมีความดันเท่ากับ 1 บรรยากาศ อัตราความเร็วสูงสุดในการแพร่กระจายของออกซิเจนที่เข้าไปในพลาสติกคือ $19\ mmol/h$ ถ้าพลาสติกมีของเหลวบรรจุอยู่ 25 มิลลิลิตรขอบเขตจำกัดของอัตราการละลายของออกซิเจนโดยการแพร่กระจายจะเกิดขึ้นเมื่ออัตราการละลายสูงถึง $760\ mmol/l.h$ จึงเป็นค่าที่สูงมากเมื่อเทียบกับความต้องการออกซิเจนตามปกติของชีวมวล นอกจากนี้ Schultz ยังได้ชี้แจงให้เห็นว่าขนาดของพลาสติกและปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ถูกทำให้เพิ่มมากขึ้นแต่อัตราส่วน A/L ยังคงค่อนข้างคงที่และค่า R_d ก็ได้รับผลกระทบเพียงเล็กน้อยกรณีเช่นนี้พบว่า การแพร่กระจายผ่านจุดสำคัญสามารถจำกัดอัตราการละลายของออกซิเจนในพลาสติกขนาดใหญ่ได้

10.15 การให้อากาศในหลอดหมุน

เครื่องมือหมุนหลอดสำหรับปั่นกวนเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วยตะกร้าใส่หลอดลักษณะคล้ายหลอดหมุนโครมแกนที่ขนานกับหลอดปกติจะหมุนด้วยความเร็วค่าประมาณ 60 รอบต่อนาที จึงมีแรงเหวี่ยงหนีออกจากศูนย์กลางต่ำมาก Hall (1960) ได้ประเมินความสามารถในการให้อากาศของหลอดหมุนแบบนี้พบว่าอัตราการละลายสูงสุดของออกซิเจนอาจประมาณได้เท่ากับ $15\ mmol/l.h$ และดูเหมือนว่าเป็นอิสระจากอัตราการหมุนที่อยู่ในช่วง 6 ถึง 60 รอบต่อนาที ดังนั้นการละลายของออกซิเจนจึงต่ำกว่าค่าที่ได้จากการเขย่าแบบหมุนวนหรือแบบย้อนกลับไปมามาก ข้อได้เปรียบจากเครื่องมือหมุนหลอดคือมีกลไกอย่างง่ายและมีราคาถูกกว่าเครื่องเขย่า หลอดหมุนเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยง เซลล์สัตว์หรือโปรคิสต์ที่ต้องการออกซิเจนน้อย

10.16 การให้อากาศแก่เชื้อจุลินทรีย์ในของเหลวที่อยู่นิ่ง

เชื้อจุลินทรีย์ในของเหลวที่อยู่นิ่ง (Static submerged culture) เช่น หลอดอาหารเหลวเพาะเลี้ยง เชื้อแบคทีเรียหรือเนื้อเยื่อชั้นเดียว (monolayer culture) ของเซลล์สัตว์ที่เพาะเลี้ยงไว้ใต้อีกกลางอาหารเหลวที่อยู่นิ่ง กรณีเช่นนี้พื้นผิวประสิทธ์ระหว่างแก๊สกับของเหลวสามารถตรวจสอบได้ ถ้าถือว่าเนื้อในของเหลวมีลักษณะเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน อัตราการละลายของออกซิเจน (mmol/min) ความหนาแน่นเยื่อของเหลวอาจกำหนดได้ว่า

$$R = K_L a (c_s - c) \quad 10.5$$

ซึ่ง a คือพื้นผิวประสิทธ์ระหว่างของเหลวกับแก๊ส Schultz และ Gaden (1956) พบว่าค่า K_L สำหรับการแพร่กระจายของออกซิเจนผ่านพื้นผิวที่อยู่นิ่งในขณะการออกซิเคชันของซิลไฟโคโคกมีไอออนของทองแดง เป็นคาตาลิสต์จะมีค่าเท่ากับ $1.2 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$ ดังนั้นอัตราการละลายสูงสุดของออกซิเจน ($K_L a c_s$) ในหลอดทดสอบที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 ม.ม. จึงเป็น 0.036 mmol/h หรือเท่ากับ 3.6 mmol/l.h ถ้าหลอดทดสอบมีของเหลวบรรจุอยู่ 10 ม.ล. และ $c_s = 0.25 \text{ mm}$ ค่าจากการทดสอบโดย Smith และ Johnson (1954) คือ 1.8 mmol/l.h ซึ่งก็อยู่ในลำดับเดียวกัน ด้ยค่าของ $K_L a$ ซึ่งค่ามากเช่นนี้ (ประมาณ 10 h^{-1}) การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดสอบที่อยู่นิ่งก็อาจถูกจำกัดด้ยออกซิเจนได้ การแพร่กระจายของออกซิเจนผ่านจุกสำลีเข้าไปในหลอดก็อาจถูกตรวจสอบได้ดังแสดงในตอนที 10.14.5 แต่ดูเหมือนว่าไม่น่าจะเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการให้ออกซิเจนแก่เชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดสอบ.