บทที่ 21
การหมักแบบเก็บกักที่มีการเติมซับสเตรต
(BATCH FERMENTATIONS WITH SUBSTRATE FEEDS)

21.1 การหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อน ((FED BATCH FERMENTATION)

21.1.1 คำนำทั่วไป

คำว่าการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อน (fed batch fermentation) ได้เสนอโดย Yoshida และคณะ (1973) หมายถึงการหมักแบบเก็บกักที่มีการเติมสื่อกลางสารอาหารใหม่ให้ลงไปอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 21.1) แต่ถ้าบางส่วนของสื่อกลางการหมักถูกถ่ายออกบ้าง เป็นครั้งคราวระบบก็จะเป็นการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนอย่างต่อเนื่องและสามารถถูกทำให้ดำเนินการต่อไปได้อย่างไม่มีระยะเวลาจำกัด การเปลี่ยนแปลงปริมาตรในการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนใช้เป็นสิ่งจำแนกให้แตกต่างจากการหมักแบบคงที่ทางเคมีซึ่งจำเป็นต้องรักษาปริมาตรของสื่อกลางการหมักไว้ให้คงที่ การหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนได้รับการปรับปรุงจากการทดลองเพื่อการหมักในอุตสาหกรรมบางอย่างรวมทั้งการผลิตเพ็นนิซิลลิน ยีสต์ทำขนมปัง และการกำจัดของเสียโดยการหมัก Yoshida และคณะ (1973) พบว่าการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนช่วยเพิ่มพืชผลหรือประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลจากไฮโดรคาร์บอนได้ถึงเกือบสองเท่ามากกว่าที่ได้รับจากการหมักแบบเก็บกักอย่างธรรมดา และผลลัพธ์เช่นนี้ยังไม่อาจจะอธิบายได้ การจำกัดอัตราความเร็วในการใช้ซับสเตรตด้วยอัตราความเร็วในการเติมซับสเตรตเป็นวิถีทางหนึ่งซึ่งอาจเอาชนะการสกดโดยเมตาโบไลต์ของผลผลิตได้ (Demain 1972b) การผลิตยีสต์ทำขนมปังอาจควบคุมความต้องการออกซิเจนของยีสต์ได้ด้วยอัตราความเร็วในการป้อนหรือเติมน้ำตาล การหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนยังเลียนแบบระบบของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติบางอย่าง เช่นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตอยู่ในท่อทางเดินปัสสาวะ (Mackintosh, 1973) พฤษฎีการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อน (Pirt, 1974) แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนอาจมีความสำคัญยิ่งและหาที่เสมอเหมือนไม่ได้ในการประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมขบวนการหมัก

21.1.2 <u>สถานะมั่นคงโดยประมาณ</u> (QUASI-STEADY STATE)

สมมุติว่าการหมักแบบเก็บกักถูกทำให้เป็นอันหนึ่งอันเดียวกันและมีการเจริญเติบโตถูกกำหนดจำกัดโดยซับสเตรตหนึ่งแต่มีซับสเตรตอื่นทั้งหมดในปริมาณซึ่งมากเกินพอ ถ้าให้ s_r = ความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต และ x = ความเข้มข้นของชีวมวลที่เวลา t ดังนั้นจะได้ว่า

$$x = x_0 + Y(s_r - s) \qquad 21.1$$

ซึ่ง x_0 = ความเข้มข้นของชีวมวลที่เป็นแหล่งเชื้อจุลินทรีย์ s = ความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตที่ยังเหลือตกค้างอยู่ในถังหมัก และ Y คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต ถือว่าเมื่อความเข้มข้นของชีวมวลเข้าถึงค่าสูงสุด x_m ของตน ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตก็ถูกใช้หมดไปจนกระทั่ง $s \ll s_r$ และถือว่าแหล่งเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับชีวมวลในขั้นสุดท้าย จะได้ว่า $x_m \approx Ys_r$

สมมุติว่าเมื่อ $x_m \approx Ys_r$ จึงเริ่มต้นป้อนหรือเติมสื่อกลางอาหารเข้าไปด้วยอัตราความเร็วในการไหลเข้า F และด้วยความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต s_r ในสื่อกลางอาหารที่ป้อนเข้าไป ชีวมวลทั้งหมดในสื่อกลางการหมักถูกกำหนดได้โดย $X = xV$ ซึ่ง V คือปริมาตรของสื่อกลางการหมักทั้งหมดที่เวลา t เนื่องจาก $x = X/V$ ผลหารนี้อาจถูกทำให้เปลี่ยนรูปไปเป็นอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตได้คือ

$$dx/dt = (V\,dX/dt - X\,dV/dt)/V^2 \qquad 21.2$$

สมการนี้สามารถแทนค่าได้ว่า $dX/dt = \mu X$ ซึ่ง μ คืออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ $dV/dt = F$ และ $F/V = D$ ซึ่ง D คืออัตราความเร็วในการเจือจาง ดังนั้นสมการที่ 21.2 จึงกลายเป็น

$$dx/dt = (\mu - D)x \qquad 21.3$$

สมการนี้โดยทั่วไปก็เป็นจริงสำหรับการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อน และถือว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะกับความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตเป็นไปตามสมการของ **Monod** คือ

$$\mu = \mu_m s/(s + K_s) \qquad 21.4$$

เมื่อ $s_r \gg K_s$ ตลอดช่วงทั้งหมดของ μ ซึ่งมีค่าตั้งแต่ศูนย์ขึ้นมาซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตจะถูกใช้ไปเกือบสมบูรณ์จนกระทั่งเมื่อ $x=x_m \approx Ys_r$, $dx/dt \approx 0$ ด้วยสภาวะเช่นนี้ในสมการที่ 21.3 จึงเป็นไปได้ว่า $\mu \approx D$

ให้ $S=$ ปริมาณทั้งหมดของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในสื่อกลางการหมักดังนั้นความสมดุลย์ของซับสเตรตจะได้ว่า

rate of increase = rate of input − rate of consumption for growth

นั่นก็คือ

$$dS/dt = Fs_r - \mu X/Y \qquad 21.5$$

เมื่อ $X=Vx_m$ จะดูเสมือนว่าซับสเตรตทั้งหมดถูกใช้ไปได้อย่างรวดเร็วพอ ๆ กันกับที่เข้าไปในถังหมักจนกระทั่ง $Fs_r \approx \mu X/Y$ ดังนั้น dS/dt และ ds/dt จึงประมาณได้เท่ากับศูนย์ในสถานะเช่นนี้ซึ่ง $dx/dt \approx 0$, $ds/dt \approx 0$ และ $\mu \approx D$ จึงถูกเรียกว่าสถานะมั่นคงโดยประมาณ **(quasi-steady state)**

เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตเป็นฟังก์ชั่นของอัตราความเร็วในการเจือจางที่สถานะมั่นคงโดยประมาณจึงแทนค่า $D \approx \mu$ ในสมการที่ 21.4 จะได้ว่า

$$s \approx DK_s/(\mu_m - D) \qquad 21.6$$

อัตราความเร็วในการเพิ่มขึ้นของชีวมวลทั้งหมดตลอดช่วงของความมั่นคงโดยประมาณถูกกำหนดได้โดย

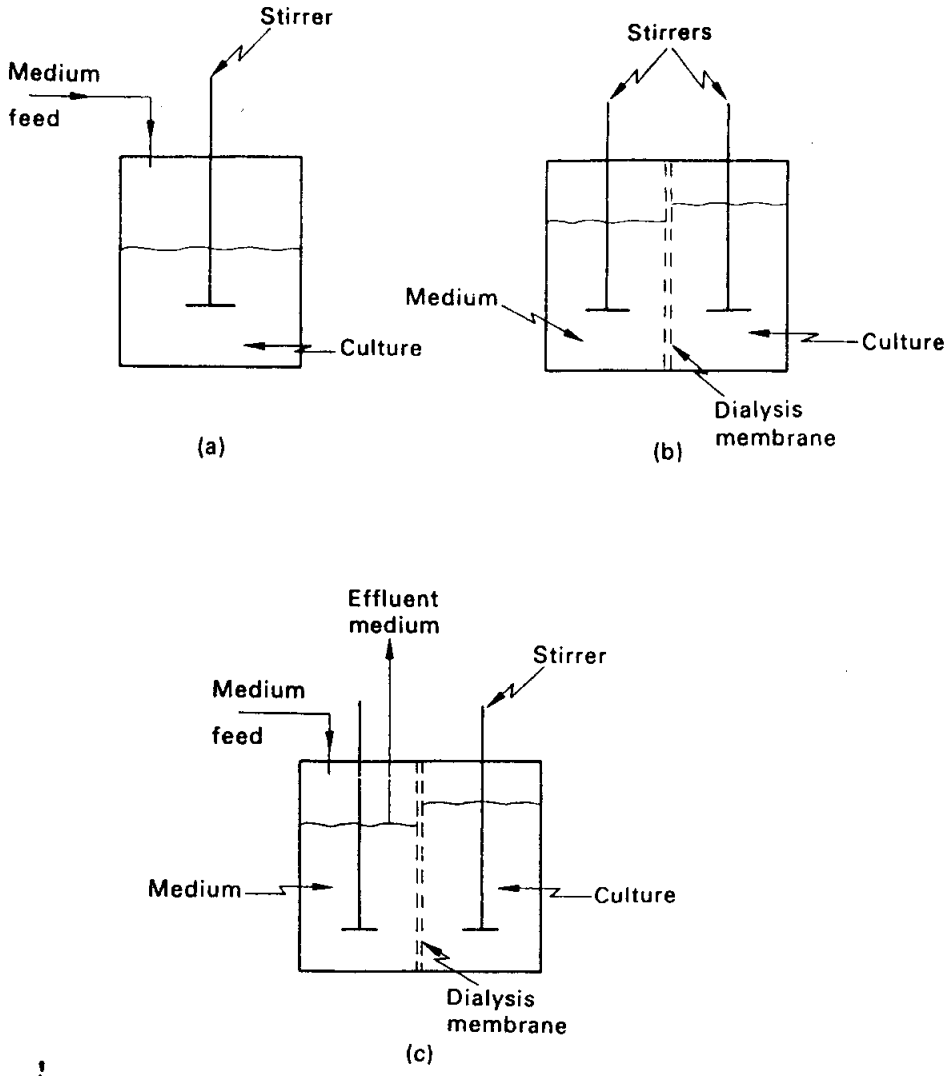
$$dX/dt = FYs_r \qquad 21.7$$

ดังนั้นจากการอินทีเกรตสมการที่ 21.7 จะได้ว่า

$$X = X_0 + FYs_r t \qquad 21.8$$

เมื่อเปรียบเทียบการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงโดยประมาณกับการหมักแบบคงที่ทางเคมีเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคง ทั้งสองกรณีจะได้ว่า $\mu=D$ แต่ D ของการหมักแบบคงที่ทางเคมีมีความคงที่ส่วน D ในการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนจะลดลงอยู่ตลอดเวลาและ μ ก็ลดลงด้วยอัตราเดียวกัน ลักษณะที่ไม่เหมือนใครของการหมักแบบเก็บกักที่ถูก

ป้อนคือเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงโดยประมาณชีวมวลจะอยู่ในสภาวะซึ่ง เปลี่ยนแปลงได้ตาม อัตราความเร็วในการ เจริญเติบโตภายใต้การควบคุม



รูปที่ 21.1 (a) Fed batch culture. (b) Batch culture dialysed against a batch of medium. (c) Batch culture dialysed against a stream of medium.

21.1.3 ผลกระทบเนื่องจากพลังงานที่ใช้เพื่อการทำนุบำรุง

พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต (Y) ถูกถือว่าคงที่มาโดยตลอด อย่างไรก็ตามถ้าซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตเป็นแหล่งพลังงาน ซับสเตรตส่วนหนึ่งจะถูกใช้ไปในการจัดเตรียมให้เป็นพลังงานเพื่อการทำนุบำรุง ดังนั้นความสมดุลย์ของพลังงานจะได้ว่า

$$dS/dt = Fs_r - \mu X/Y_G - mX \qquad 21.9$$

ซึ่ง Y_G คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตที่แท้จริง และ m คือสัมประสิทธิการทำนุบำรุง ถ้าสเปียงเพื่อการทำนุบำรุง mX มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับสเปียงเพื่อการเจริญเติบโต ($\mu X/Y_G$) จะสามารถกำหนดได้ว่า $Fs_r \approx \mu X/Y_G$ และ $\mu \approx D$ กำหนดให้ $dS/dt = 0$ แล้วแทนค่า $D=\mu$ และ $X = Ys_r$ ซึ่ง Y คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตทั้งหมด จากสมการที่ 21.9 จะได้ว่า

$$1/Y \approx 1/Y_G + m/D \qquad 21.10$$

ดังนั้นการหมักแบบเก็บกักที่ถูกปิดล้อมจึงถูกใช้เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์อีกอย่างหนึ่งในการตรวจสอบพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงและทำนายพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตที่อัตราความเร็วในการเจือจางต่าง ๆ กัน

เมื่อซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตเป็นแหล่งพลังงาน ปริมาณทั้งหมดของชีวมวลในถังหมักจะมีค่าสูงสุดได้เมื่อ

$$X_m = Fs_r/m \qquad 21.11$$

21.2 การเกิดผลผลิต

21.2.1 เมื่อพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิต ($Y_{p/x}$) คงที่

ในสถานะมั่นคงโดยประมาณของการหมักแบบเก็บกักที่ถูกปิดล้อมด้วยค่า $x_m \approx Ys_r$ ความเข้มข้นของผลผลิตจะเป็น $p \approx Y_{p/s}s_r$ ซึ่ง $Y_{p/s}$ คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิตบนพื้นฐานของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตที่ถูกใช้ไป อัตราความเร็วในการออกมาของผลผลิตจึงเท่ากับ $FY_{p/s}s_r$

21.2.2 เมื่ออัตราความเร็วเฉพาะในการเกิดผลผลิต q_p คงที่

กรณีเช่นนี้อัตราความเร็วในการเพิ่มขึ้นของผลผลิตปริมาณทั้งหมด (P) ในสถานะมั่นคงโดยประมาณอาจถูกกำหนดได้โดย

$$dP/dt = q_p x_m V = q_p x_m (V_0 + Ft) \qquad 21.12$$

ซึ่ง V_0 คือปริมาตรของสื่อกลางการหมักที่เวลาตั้งต้น จากการอินทีเกรตจะได้ว่า

$$P = P_0 + q_p x_m (V_0 + Ft/2)t \qquad 21.13$$

ซึ่ง P_0 คือปริมาณทั้งหมดของผลผลิตที่เวลาเริ่มต้น ให้ p และ p_0 เป็นความเข้มข้นของผลผลิตที่เวลา t และเวลาเริ่มต้นตามลำดับ แทนค่า $pV=P$, $p_0V_0=P_0$, $D=F/V$ ดังนั้นจะได้ว่า

$$p = p_0V_0/V + q_p x_m (V_0/V + Dt/2)t \qquad 21.14$$

แต่บางครั้งค่าที่แท้จริงของ q_p และ x_m ก็ไม่อาจกำหนดหาได้เนื่องจากมีความยุ่งยากในการตรวจสอบชีวมวล อย่างไรก็ตามถ้าพบว่าอัตราความเร็วในการสังเคราะห์ผลผลิตคงที่จะทำให้สามารถแทนค่า $r=q_p x_m$ ในสมการที่ 21.14 ได้เป็น

$$p = p_0V_0/V + r(V_0/V + Dt/2)t \qquad 21.15$$

สมการนี้เคยถูกใช้โดย Pirt (1974) เพื่อตรวจสอบหาปริมาณของเพ็นนิซิลลินที่อาจผลิตขึ้นได้ในทางอุตสาหกรรมด้วยการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อน

21.2.3 เมื่อค่า q_p เป็นฟังก์ชั่นซับซ้อนกับ μ

เมื่อค่า q_p สำหรับผลผลิตเปลี่ยนแปลงอย่างซับซ้อนกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงโดยประมาณของการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อน การเพิ่มขึ้นของผลผลิตทั้งหมดในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ dt อาจเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$dP = q_p(t) X \, dt \qquad 21.16$$

ซึ่ง $q_p(t)$ เป็นฟังก์ชั่นที่กำหนดค่าของ q_p ที่เวลา t สำหรับค่า X ที่เวลา t ในสถานะมั่นคงโดยประมาณอาจถูกแทนค่าได้ว่า

$$X = x_m V = x_m (V_0 + Ft) \qquad 21.17$$

ดังนั้นปริมาณทั้งหมดของผลผลิตที่เกิดขึ้นในช่วงระหว่างเวลา t จึงเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$P - P_0 = x_m \int_0^t q_p(t)(V_0 + Ft) \, dt \qquad 21.18$$

แทนค่า $pV=P$ และ $p_0V_0=P_0$ จะได้ว่า

$$p = \frac{p_0V_0}{V}+\frac{x_m}{V}\int_0^t q_p(t)(V_0+Ft)\,dt \qquad 21.19$$

ถ้าแทนค่า $r(t)=q_p(t)x_m$ ในสมการที่ 21.19 จะได้ว่า

$$p = \frac{p_0V_0}{V}+\frac{1}{V}\int_0^t r(t)(V_0+Ft)\,dt \qquad 21.20$$

เพื่อที่จะประเมินค่าอินดีเกรดจำเป็นต้องตรวจสอบค่า q_pในฐานะเป็นฟังก์ชันของ t ตลอดช่วงของสถานะมั่นคงโดยประมาณเสียก่อนซึ่งอาจทำได้ดังต่อไปนี้ เนื่องจากความเข้มข้นของผลผลิต $p=P/V$ ผลหารนี้ถูกทำให้เปลี่ยนรูปได้เป็น

$$dp/dt = \frac{V(dP/dt)-P(dV/dt)}{V^2} \qquad 21.21$$

แทนค่า $dP/dt=q_pX$, $X=Vx_m$, $P=p\,V$, $dV/dt=F$ และ $F/V=D$ จะได้ว่า

$$dp/dt = q_px_m-Dp \qquad 21.22$$

ดังนั้น

$$q_p = (dp/dt+Dp)/x_m \qquad 21.23$$

ถ้าให้ $q_px_m=r$ จะได้ว่า

$$r = dp/dt+Dp \qquad 21.24$$

ค่า q_p หรือ r ถูกตรวจสอบได้จากการทดลองเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงโดยประมาณของการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนแล้ว เขียนเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง p กับ t จากความลาดเอียงของเส้นกราฟจะได้ค่า dp/dt ที่เวลาต่าง ๆ กัน เมื่อใช้สมการที่ 21.23 และ 21.24 ก็จะได้ค่าที่แสดงออกด้วยเส้นกราฟของ $q_p(t)$ และ $r(t)$ ดังนั้นค่าอินดีเกรดของสมการที่ 21.19 และ 21.20 อาจถูกประเมินได้จากกราฟ

21.3 การหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนซ้ำอย่างต่อเนื่อง (REPEATED FED BATCH FERMENTATION)

ในระบบการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนซ้ำอย่างต่อเนื่องส่วนหนึ่งของสื่อกลางการหมักปริมาตรแน่นอนจะถูกกำจัดออกเป็นระยะเมื่อครบรอบหรือเมื่อของเหลวที่เป็นสื่อกลางการหมักมีปริมาตรถึงขีดที่กำหนด จึงหมายความว่าปริมาตรของสื่อกลางการหมัก อัตราความเร็วในการเจือจาง และตัวแปรเสริมทางเมตาโบลิซึมที่เกี่ยวข้อง เช่น อัตราความเร็ว

ในการเจริญเติบโตเฉพาะจะดำเนินการเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะเป็นวงจร เมื่อพิจารณาถึงกรณีเช่นนี้ถ้าช่วงระยะเวลาครบรอบวงจร (t_w) คงที่อาจถือได้ว่าตลอดช่วงของขบวนการหมักจะอยู่ในสถานะมั่นคงโดยประมาณ เมื่อปริมาตรของสื่อกลางการหมักเพิ่มขึ้นจนถึงค่าหนึ่งคือ V_w สัดส่วนปริมาตรที่แน่นอนของสื่อกลางจะถูกกำจัดออกจากถังหมักจนกระทั่งมีปริมาตรเหลืออยู่เป็น $V_0=\gamma V_w$ แทนค่าสำหรับ V_0 ในสมการที่ 21.14 จะได้ความเข้มข้นของผลผลิตที่เวลาซึ่งสื่อกลางการหมักถูกกำจัดออก นั่นก็คือการครบรอบวงจรการหมัก

$$p_w = \gamma p_0 + q_p x_m \left(\gamma + \frac{D_w t_w}{2}\right) t_w \qquad 21.25$$

ซึ่ง $D_w=F/V_w$ คืออัตราความเร็วในการเจือจาง เมื่อครบรอบวงจร ระยะเวลาสำหรับวงจรคือระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาตรของสื่อกลางการหมักจาก γV_w ไปเป็น V_w นั่นก็คือ $t_w=(V_w-\gamma V_w)/F$ เนื่องจาก $F=D_w V_w$ ดังนั้นช่วงระยะเวลาสำหรับวงจรจึงถูกกำหนดได้โดย

$$t_w = (1-\gamma)/D_w \qquad 21.26$$

แทนค่าสำหรับ t ในสมการที่ 21.25 จะได้ความเข้มข้นของผลผลิตเมื่อครบรอบวงจรเป็น

$$p_w = \gamma p_0 + \frac{q_p x_m}{2D_w}(1-\gamma^2) \qquad 21.27$$

ถ้า q_p ไม่คงที่และเปลี่ยนแปลงไปได้ตลอดวงจรก็จะเป็นไปตามสมการที่ 21.19 คือ ความเข้มข้นของผลผลิตเมื่อครบรอบวงจรถูกกำหนดได้โดย

$$p_w = \gamma p_0 + x_m \int_0^{t_w} q_p(t)(\gamma + D_w t)\, dt \qquad 21.28$$

ถ้าการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนซ้ำอยู่ในสถานะมั่นคงโดยประมาณและมีความเข้มข้นของผลผลิตที่จุดเริ่มต้นของวงจรเท่ากับ p_0 ดังนั้นความเข้มข้นของผลผลิตเมื่อครบรอบวงจรแรกคือ p_1 จะถูกกำหนดได้โดยสมการ

$$p_1 = \gamma p_0 + K \qquad 21.29$$

ซึ่งถ้าค่า q_p คงที่ค่า K อาจถูกกำหนดได้คือ

$$K = q_p x_m (1-\gamma^2)/2D_w \qquad 21.30$$

แต่ถ้าค่า q_p เปลี่ยนแปลงตลอดวงจรค่า K จะถูกกำหนดได้คือ

$$K = x_m \int_0^{t_w} q_p(t)(\gamma + D_w t)\, dt \qquad 21.31$$

ต่อมาเมื่อครบวงจรในรอบที่สองความเข้มข้นของผลผลิตอาจถูกกำหนดได้คือ

$$p_2 = \gamma p_1 + K = \gamma^2 p_0 + \gamma K + K \qquad 21.32$$

และต่อมาเมื่อครบวงจรในรอบที่ n ความเข้มข้นของผลผลิตอาจถูกกำหนดได้คือ

$$p_n = \gamma p_{n-1} + K = \gamma^n p_0 + K(\gamma^{n-1} + \gamma^{n-2} + \ldots + \gamma + 1) \qquad 21.33$$

จากการรวมกันของค่าที่เรียงลำดับเป็นอนุกรมเลขาคณิตด้วยสัดส่วนคงที่ γ จะได้ว่า

$$p_n = \gamma^n p_0 + \frac{K(1-\gamma^{n-1})}{1-\gamma} \qquad 21.34$$

ถ้า n มีค่ามากจะได้ว่า $\gamma^n p_0 \to 0$ และ $\gamma^{n-1} \to 0$ สมการที่ 21.34 อาจถูกประมาณได้ว่า

$$p_n = K/(1-\gamma) \qquad 21.35$$

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้โดยไม่จำกัดค่าตั้งต้นว่าความเข้มข้นของผลผลิตในการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนซ้ำอย่างต่อเนื่องมีแนวโน้มที่จะเข้าใกล้กับค่า p_n ตามสมการที่ 21.35

ถ้าค่า q_p คงที่จะสามารถแทนค่าสำหรับ K ในสมการที่ 21.30 ได้เป็น

$$p_n = q_p x_m (1+\gamma)/2D_w \qquad 21.36$$

ในขณะที่ปริมาตรของสื่อกลางการหมักลดลงโดยการกำจัดออกเมื่อครบรอบวงจร $\gamma \to 1$ และเป็นไปตามสมการที่ 21.36 คือ $p_n \to q_p x_m / D_w$ ซึ่งก็เป็นอย่างเดียวกันกับความเข้มข้นของผลผลิตที่คาดหวังเอาไว้ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคง ดังนั้นถ้าค่า q_p คงที่ความเข้มข้นของผลผลิตที่ได้จากการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนซ้ำอย่างต่อเนื่องก็จะไม่เกินกว่าที่ได้จากการหมักแบบคงที่ทางเคมีเมื่อ $D = D_w$ อย่างไรก็ตามสถานะมั่นคงโดยประมาณอาจเป็นสภาวะที่กระตุ้นให้เกิดผลผลิตบางอย่างจนกระทั่งมีค่า q_p มากเกินกว่าที่ได้จากสถานะมั่นคงของการหมักแบบคงที่ทางเคมี(ตอนที่ 21.4)

21.4 ประโยชน์จากการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อน

การหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนเป็นเครื่องมืออันหนึ่งที่ใช้ในการทำให้การเจริญ-เติบโตถูกกำหนดจำกัดโดยซับสเตรต ด้วยวิธีการอันนี้ Yoshida และคณะ(1973)ได้ใช้อีซาเคเคนกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตของ Candida tropicalis พบว่าพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต(0.95)ที่ได้ภายใต้สภาวะจำกัดซับสเตรตเกือบเป็นสองเท่า

ของที่ได้จากการหมักแบบเก็บกักอย่างธรรมดา สาเหตุซึ่งทำให้ผลผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตแตกต่างกันมากเช่นนี้ยังไม่อาจที่จะอธิบายได้ **Bainbridge** และคณะ (1971) ได้ใช้วิธีการนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบและโครงสร้างของ **Aspergillus nidulans** ที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเท่ากับศูนย์โดยการจำกัดน้ำตาลกลูโคสที่ป้อนให้มีเพียงแค่พอเป็นสะเบียงกรังเพื่อการทำนุบำรุงเท่านั้น ความสามารถในการจำกัดอัตราความเร็วในการป้อนซับสเตรตเป็นประโยชน์อย่างหนึ่งเมื่ออัตราความเร็วในการถ่ายเทออกซิเจน (K_La) สามารถจำกัดอัตราความเร็วของขบวนการได้ ความสำคัญในการประยุกต์ทางนิเวศวิทยาของวิธีการนี้ได้ถูกใช้เพื่อกระตุ้นการติดเชื้อของกระเพาะปัสสาวะในมนุษย์ (**Mackintosh**, 1973) จากการสังเกตุโดย **Pirt** (1971) พบว่าการเติมซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตด้วยอัตราความเร็วคงที่มีผลทำให้ชีวมวลทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างเป็นเส้นตรงจึงเป็นหลักฐานสนับสนุนสมการที่ 21.8 หลักการสำคัญของทฤษฎีนี้คือเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงโดยประมาณจุลินทรีย์มีการปรับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของตนเองโดยอัตโนมัติจนกระทั่งยังคงเท่ากันกับอัตราความเร็วในการเจือจาง กรณีเช่นนี้คล้ายกับว่าการเริ่มต้นของวงจรการหมักถูกทำให้หมดไปเมื่อต้องการเปลี่ยนแปลงอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะให้สูงขึ้นอย่างทันทีทันใด จากผลการศึกษาของ **Meteles** และคณะ (1965) เสนอว่าในการหมักแบบคงที่ทางเคมีของแบคทีเรียอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะสามารถถูกปรับให้สูงขึ้นได้อย่างทันทีทันใดในช่วงประมาณ 20% μ_m แต่ถ้าต้องการปรับให้สูงขึ้นถึงประมาณ 40% μ_m จะต้องใช้เวลาประมาณสามเท่าของระยะเวลาทวีคูณ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของอัตโนมัติสังเคราะห์ (ตอนที่ 24.21) เสนอว่าอัตราความเร็วในการปรับค่าที่สถานะมั่นคงโดยประมาณในการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนจะไม่เหมือนกันกับของสถานะมั่นคงในการหมักแบบคงที่ทางเคมี ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบของเอนไซม์ในสถานะทั้งสองแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามยังต้องการข้อมูลอีกมากเกี่ยวกับผลกระทบเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอย่างทันทีทันใดในอัตราความเร็วในการเจือจางที่สูงขึ้นอย่างทันทีทันใดเมื่อครบรอบวงจรซึ่งอาจทำได้โดยการดูดเอาสื่อกลางการหมักออกด้วยอัตราความเร็วที่ถูกควบคุม

ความสามารถในการจำกัดอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะให้อยู่ใน

ขั้นต่ำสุดอาจมีความจำเป็นต่อการป้องกันการเสื่อมสลายของกิจกรรมในการสังเคราะห์ของชีวมวล ตัวอย่างเช่นการผลิตเพ็นนิซิลลิน (Pirt & Righelato, 1967) จากรายละเอียดรายงานต่าง ๆ ได้ชี้แสดงให้เห็นว่าการหมักเพ็นนิซิลลินในงานขั้นอุตสาหกรรมปัจจุบันนิยมใช้การหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนซ้ำอย่างต่อเนื่องซึ่งได้ปรับปรุงมาจากพื้นฐานการทดลอง อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะต่ำสุดซึ่งช่วยป้องกันการเสื่อมสลายของกิจกรรมในการสังเคราะห์เพ็นนิซิลลินคือ 0.014 h^{-1} (Pirt & Righelato, 1967) Pirt (1974) ได้ให้รายละเอียดเกี่ยวกับปริมาณเพ็นนิซิลลินที่อาจได้รับจากการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนซ้ำอย่างต่อเนื่อง

ลักษณะสำคัญที่สุดซึ่งไม่เหมือนใครของการหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนคือการทำให้มีสภาวะเปลี่ยนแปลงหรือสภาวะชั่วคราวเกิดขึ้นได้ในช่วงระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตที่แน่นอนต่าง ๆ มีหลักฐานแสดงว่าอัตราความเร็วสูงสุดของบางขบวนการสามารถถูกทำให้เกิดขึ้นได้เพียงชั่วครั้งชั่วคราวเท่านั้น ตัวอย่างเช่นการผลิตแอนติเจนบางชนิดของแบคทีเรีย (Pirt et al., 1961) และการผลิตเพ็นนิซิลลิน เป็นต้น (Wright & Calam, 1968)

การหมักแบบเก็บกักที่ถูกป้อนเป็นกลวิธีการซึ่งง่ายกว่าการหมักแบบคงที่ทางเคมีเนื่องจากไม่จำเป็นต้องรักษาปริมาตรของสื่อกลางการหมักไว้ให้คงที่ การรักษาปริมาตรของสื่อกลางการหมักไว้ให้คงที่เป็นสิ่งจำเป็นที่สุดสำหรับการหมักแบบคงที่ทางเคมี

21.5 การหมักแบบไดอะไลสิส (DIALYSIS FERMENTATION)

21.5.1 การหมักแบบไดอะไลสิสอย่างเก็บกัก (BATCH DIALYSIS)

การหมักแบบนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 21.1(b) ซับสเตรตจากถังสื่อกลางอาหารจะถูกปล่อยให้แพร่กระจายผ่านเยื่อไดอะไลสิสเข้าไปในสื่อกลางการหมัก อัตราความเร็วในการแพร่กระจายของสิ่งที่ละลายผ่านเยื่อถือว่าเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความแตกต่างของ

ความเข้มข้นทั้งสองข้าง (Schulz & Gerharde, 1969) และการหมักถือว่าสื่อกลางที่ซึมผ่านเยื่อเข้ามาถูกทำให้เป็นอันหนึ่งอันเดียวกันกับสื่อกลางอาหารหรือสื่อกลางการหมัก แต่ละสิ่งด้วยการปั่นกวนหรือคนอยู่ตลอดเวลา

ให้ A = พื้นที่ของแผ่นเยื่อไดอะไลสิส , s = ความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในสื่อกลางการหมัก , s_m = ความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในสื่อกลางอาหารนอกสื่อกลางการหมัก , $s_{m(0)}$ = ความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในสื่อกลางอาหารนอกสื่อกลางการหมักที่เวลาศูนย์ X = ชีวมวลทั้งหมดที่เวลา t, X_0 = ชีวมวลทั้งหมดเมื่อ $t=0$, V_c = ปริมาตรของสื่อกลางการหมัก , V_m = ปริมาตรของสื่อกลางอาหารนอกสื่อกลางการหมัก สมมุติว่าที่เวลาเริ่มต้นการแพร่กระจายของซับสเตรตผ่านเยื่อกลายเป็นสิ่งจำกัดการเจริญเติบโต ดังนั้นอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของชีวมวลถูกกำหนดได้โดย

$$\frac{dX}{dt} = \psi A Y(s_m - s) \qquad 21.37$$

ซึ่ง ψ = สัมประสิทธิการแพร่กระจายผ่านเยื่อไดอะไลสิสสำหรับซับสเตรตใดซับสเตรตหนึ่งโดยเฉพาะ และ Y คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต ถือว่าเมื่อการเจริญเติบโตถูกจำกัดโดยอัตราความเร็วในการแพร่กระจายของซับสเตรต , $s \ll s_m$ จนกระทั่งสามารถกำหนดได้ว่า $(s_m - s) \approx s_m$ ดังนั้น

$$dX/dt = \psi A Y s_m \qquad 21.38$$

และอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะคือ

$$\mu = \psi A Y s_m / X \qquad 21.39$$

จากความสมดุลย์ของซับสเตรตข้างที่เป็นสื่อกลางอาหารเมื่อการเจริญเติบโตถูกจำกัดโดยการแพร่กระจาย

$$V_m \, ds_m/dt = -\psi A s_m \qquad 21.40$$

อินดีเกรตสมการที่ 21.40 จะได้ว่า

$$s_m = s_{m(0)} e^{-\phi t} \qquad 21.41$$

ซึ่ง $\phi = \psi A / V_m$ แทนค่าสำหรับ s_m ในสมการที่ 21.38 แล้วอินดีเกรตจะได้ว่า

$$X = X_0 + V_m Y s_{m(0)}(1 - e^{-\phi t}) \qquad 21.42$$

ถ้าไม่มีความต้องการซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตนี้เพื่อการทำนุบำรุงในขณะที่ $t \to \infty$ ชีวมวลก็จะเข้าใกล้กับค่าสูงสุดซึ่งถูกกำหนดได้โดย

$$X_m = X_0 + V_m Y s_{m(0)} \qquad 21.43$$

ปริมาณทั้งหมดของผลผลิตที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตซึ่งปรากฏที่เวลา t คือ

$$P = Y_{p/x} X = Y_{p/x} X_0 + V_m Y_{p/s} s_{m(0)} (1 - e^{-\phi t}) \qquad 21.44$$

ซึ่ง $Y_{p/x}$ และ $Y_{p/s}$ คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิตบนพื้นฐานของชีวมวลที่เกิดขึ้นและซับสเตรตที่ใช้ตามลำดับ เมื่อ q_p คงที่จะได้ว่า $dP/dt = q_p X$ แทนค่าสำหรับ X แล้วอินดีเกรตจะได้ว่า

$$P = P_0 + q_p \left\{ (X_0 + V_m Y s_0) t + \frac{V_m^2 Y s_0}{\psi A} (e^{-\phi t} - 1) \right\} \qquad 21.45$$

ถ้าผลผลิตไม่สามารถแพร่กระจายผ่านเยื่อได้ความเข้มข้นขั้นสุดท้ายของผลผลิตจึงเป็น

$$p = P/V_c \qquad 21.46$$

อย่างไรก็ตามถ้าผลผลิตสามารถแพร่กระจายผ่านเยื่อได้ ความเข้มข้นขั้นสุดท้ายของผลผลิตจึงเป็น

$$p = P/(V_c + V_m) \qquad 21.47$$

ดังนั้นการหมักแบบไดอะไลสิสจึงมีผลทำให้ผลผลิตที่ไม่อาจแพร่กระจายผ่านเยื่อได้เข้มข้นขึ้นด้วยปัจจัย $(V_c + V_m)/V_c$

21.5.2 การหมักแบบไดอะไลสิสต่อกระแสของสื่อกลางอาหาร

ระบบนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 21.1 (c) สื่อกลางอาหารนอกสื่อกลางการหมักถูกสมมุติว่าผสมเข้ากันเป็นอย่างดีและสื่อกลางอาหารใหม่ถูกเติมเข้าไปด้วยอัตราความเร็ว F ให้ s_r = ความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในสื่อกลางอาหารใหม่ที่เติมเข้าไป อัตราความเร็วในการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในสื่อกลางอาหารนอกสื่อกลางการหมักจึงเป็น

$$V_m \, ds_m/dt = F s_r - F s_m - \psi A (s_m - s) \qquad 21.48$$

เมื่อการเจริญเติบโตถูกจำกัดด้วยการแพร่กระจายจึงถือได้ว่า $s_m \gg s$ ในสภาวะเช่นนี้สมการที่ 21.48 อาจถูกประเมินได้เป็น

$$V_m\, ds_m/dt = Fs_r - (F+\psi A)s_m \qquad 21.49$$

อินดีเกรตสมการที่ 21.49 จะได้

$$s_m = [Fs_r - \{Fs_r - (F+\psi A)s_{m(0)}\}\, e^{-\phi t}]/(F+\psi A) \qquad 21.50$$

ซึ่ง $\phi = (F+\psi A)/V_m$ ในขณะที่ $t \to \infty$ และ $e^{-\phi t} \to 0$ สมการที่ 21.50 อาจถูกทำให้เป็นไปได้ว่า

$$s_m \approx Fs_r/(F+\psi A) \qquad 21.51$$

อัตราความเร็วในการเพิ่มขึ้นของชีวมวลทั้งหมดเมื่อการเจริญเติบโตถูกจำกัดด้วยการแพร่กระจายและ $s \approx 0$ จะถูกกำหนดได้โดย

$$dX/dt = \psi A s_m Y \qquad 21.52$$

เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น s_m มีแนวโน้มที่จะเข้าใกล้กับค่าซึ่งถูกกำหนดโดยสมการที่ 21.51 และอัตราความเร็วในการเพิ่มขึ้นของชีวมวลทั้งหมดจะคล้อยตามสมการคือ

$$(dX/dt)_\infty = \psi A Y Fs_r/(F+\psi A) \qquad 21.53$$

นั่นก็คือชีวมวลทั้งหมดมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราความเร็วคงที่

ในระบบนี้ชีวมวลทั้งหมดควรเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเชื้อจุลินทรีย์หนาแน่นมากไม่อาจปั่นกวนต่อไปได้หรือจนกระทั่งอัตราความเร็วในการแพร่กระจายของซับสเตรตผ่านเยื่อเท่ากันกับที่ใช้เป็นสะเปียงเพื่อการทำนุบำรุงอย่างใดอย่างหนึ่ง ความเข้มข้นของผลผลิตอาจคำนวนหาได้ในทำนองเดียวกันกับการหมักแบบไดอะไลสิสอย่างเก็บกัก

21.5.3 <u>ประโยชน์จากการหมักแบบไดอะไลสิส</u>

การหมักแบบไดอะไลสิสถูกใช้ประโยชน์ในขั้นพื้นฐานสามประการ คือ เป็นอีกวิถีทางหนึ่งซึ่งทำให้มีการเจริญเติบโตโดยจำกัดซับสเตรต เป็นที่น่าสังเกตุว่าในการหมักแบบไดอะไลสิสอย่างเก็บกักถึงแม้ว่าการเจริญเติบโตอาจถูกกำหนดได้ด้วยซับสเตรตแต่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะก็ลดลงตามเวลา จึงแตกต่างจากการหมักแบบคงที่ทางเคมีที่สถานะมั่นคง ประโยชน์ประการที่สองคือช่วยทำให้ชีวมวลและผลผลิตที่ไม่

อาจแพร่กระจายผ่านเยื่อได้เข้มข้นขึ้น ตัวอย่างเช่นการผลิตวัคซีนและเอนไซม์ Gallup และ Gerhardt (1963) แสดงให้เห็นว่า Serratia marcescens สามารถเจริญเติบโตได้จนกระทั่งมีความเข้มข้นสูงถึง 9 กรัมน.น.แห้ง/100 มล. ในการหมักแบบไดอะไลสิส เปรียบเทียบกับ 0.8 กรัมน.น.แห้ง/100 มล. โดยไม่มีการไดอะไลสิส ดังนั้นวิธีการนี้จึงช่วยให้สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จนมีความหนาแน่นสูงมากได้ด้วยซับสเตรตที่เจือจาง ประโยชน์ประการที่สามคือทำให้ผลผลิตที่ยับยั้งการเจริญเติบโตซึ่งสามารถแพร่กระจายผ่านเยื่อได้มีความเข้มข้นต่ำลง ตัวอย่างเช่นไทโอบาซิลไลสามารถเจริญเติบโตจนมีความหนาแน่นสูงมากได้ด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ทำให้เกิดผลผลิตยับยั้งเช่นกรดไพรูวิคแต่ถูกกำจัดออกไปจากสื่อกลางการหมักด้วยการไดอะไลสิส (Borichewski & Umbreit, 1966)

การหมักแบบสองวัฏภาค (Biphasic culture) ถูกเรียกโดย Tyrell และคณะ (1958) เพื่อใช้เรียกระบบการหมักซึ่งประกอบด้วยสื่อกลางอาหารเหลวที่ถูกปิดทับด้วยสื่อกลางอาหารแข็งแบบเจลหรือวุ้น ระบบนี้ก็คล้ายกันกับการหมักแบบไดอะไลสิสอย่างเก็บกักเว้นแต่ความต้านทานต่อการแพร่กระจายของซับสเตรตออกจากเจลจะเพิ่มมากขึ้นตามเวลา

21.6 การหมักด้วยแคปซูลเพื่อการแพร่กระจาย (DIFFUSION CAPSULE)

แคปซูลเพื่อการแพร่กระจายดังแสดงในรูปที่ 21.2 เป็นวิธีการหนึ่งเพื่อป้อนซับสเตรตเข้าไปในสื่อกลางการหมักด้วยอัตราความเร็วคงที่โดยเฉพาะในฟลาสค์เขย่า (Pirt, 1971) แคปซูลมีรูเล็ก ๆ ที่ถูกปิดผนึกด้วยเยื่อไดอะไลสิส เมื่อแคปซูลถูกบรรจุด้วยสารละลายซับสเตรตแล้วจุ่มลงไปในสื่อกลางการหมักที่เป็นน้ำ ซับสเตรตจะแพร่กระจายออกมาเป็นระยะเวลาซึ่งยาวนานด้วยอัตราความเร็วคงที่และเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของซับสเตรตเริ่มต้น ปรากฏการณ์ที่ขัดแย้งกับกฎการแพร่กระจายของ Fick เช่นนี้ยังไม่อาจที่จะอธิบายได้

ถ้าอัตราความเร็วในการแพร่กระจายของซับสเตรตออกจากแคปซูลคือ G กรัม/ช.ม. จะได้อัตราความเร็วในการเพิ่มขึ้นของชีวมวลทั้งหมดในสื่อกลางการหมักคือ

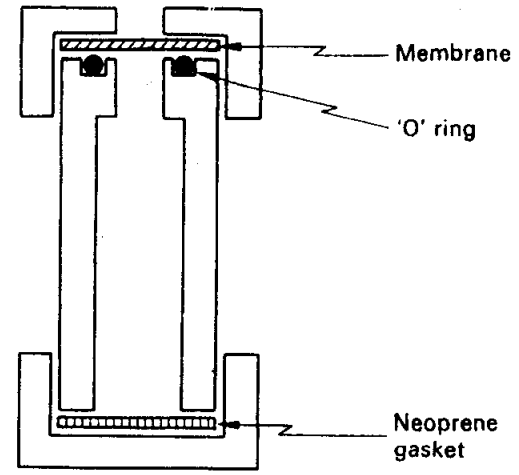
$$X = X_0 + GYt \qquad 21.54$$

ซึ่ง Y คือพีชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต ให้ V= ปริมาตรของสื่อกลางการหมัก และ x= ความเข้มข้นของชีวมวลในสื่อกลางการหมัก เมื่อแทนค่า $xV=X$ ในสมการที่ 21.54 จะได้ว่า

$$x = x_0 + GYt/V \qquad 21.55$$

ความถูกต้องสมบูรณ์ของสมการที่ 21.55 ซึ่งชี้แสดงถึงการเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงของความเข้มข้นชีวมวลได้ถูกตรวจสอบโดย **Pirt** (1971) อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะซึ่งอาจคำนวนได้จากสมการที่ 21.54 คือ

$$\mu = GY/Vx \qquad 21.56$$



รูปที่ 21.2 Diffusion capsule to feed substrate at a constant rate.

ความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตอาจถูกตรวจสอบได้โดยแทนค่า $\mu=\mu_m s/(s+K_s)$ ในสมการที่ 21.56 ดังนั้นจึงได้ว่า

$$s = GYK_s/(\mu_m Vx - GY) \qquad 21.57$$

เมื่อแทนค่าสำหรับ x โดยใช้สมการที่ 21.55 จะได้ว่า

$$s = K_s/\{\mu_m(t + Vx_0/GY) - 1\} \qquad 21.58$$

ความเข้มข้นของผลผลิตที่เวลา t เมื่อ q_p คงที่คือ

$$p = p_0 + q_p t(x_0 + G\,Yt/2V) \qquad 21.59$$

O'Sullivan และ Pirt (1973) ได้ใช้สมการนี้คำนวนหาค่า q_p สำหรับการผลิตเพ็นนิซิลลินโดยการหมักในฟลาสค์เขย่าซึ่งการเจริญเติบโตถูกกำหนดจำกัดด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ป้อนออกมาจากแคปซูลเพื่อการกระจาย.