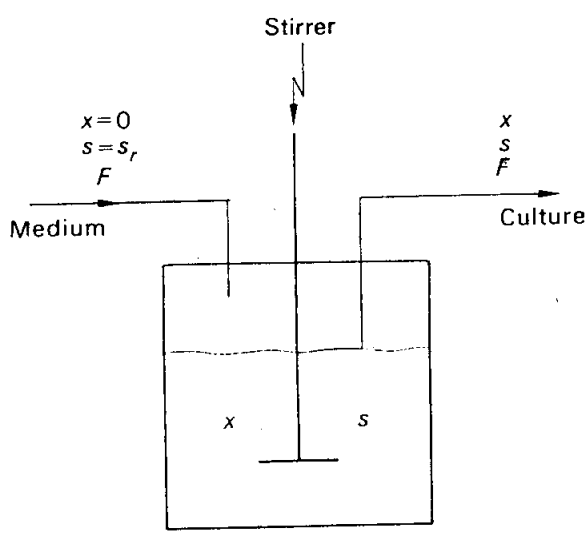
บทที่ 5
การหมักแบบคงที่ทางเคมี
(CHEMOSTAT FERMENTATION)

การทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีอายุยืนยาวออกไปโดยการเติมสื่อกลางอาหาร (medium) ใหม่ลงไปอย่างต่อเนื่องและมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตออกมาอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกันได้ถูกศึกษากันมามากกว่าครึ่งศตวรรษ การหมักอย่างไหลต่อเนื่อง (Continuous-flow Fermentation) ในขั้นพื้นฐานมีสองแบบคือ การหมักแบบปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์ไหลผ่าน (Plug-flow Fermentation) และการหมักแบบคงที่ทางเคมี (Chemostat Fermentation) ในกรณีของการหมักแบบปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์ไหลผ่านดังแสดงในบทที่ 4 ตอนที่ 4.5 โดยสมบูรณ์แบบแล้วเชื้อจุลินทรีย์จะต้องไหลผ่านไปในท่อหรือถังหมักโดยไม่มีการผสมกันเลยระหว่างส่วนที่เข้ามาก่อนกับส่วนที่เข้ามาทีหลัง แต่ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีจะต้องประกอบด้วยการผสมกันอย่างสมบูรณ์ของชีวมวลแขวนลอยกับสื่อกลางอาหารเหลวที่เติมเข้าไปด้วยอัตราความเร็วคงที่และเชื้อจุลินทรีย์จะถูกเก็บเกี่ยวด้วยอัตราเดียวกันจนกระทั่งปริมาตรของสิ่งที่บรรจุอยู่ภายในถังหมักคงที่ ดังรูปที่ 5.1



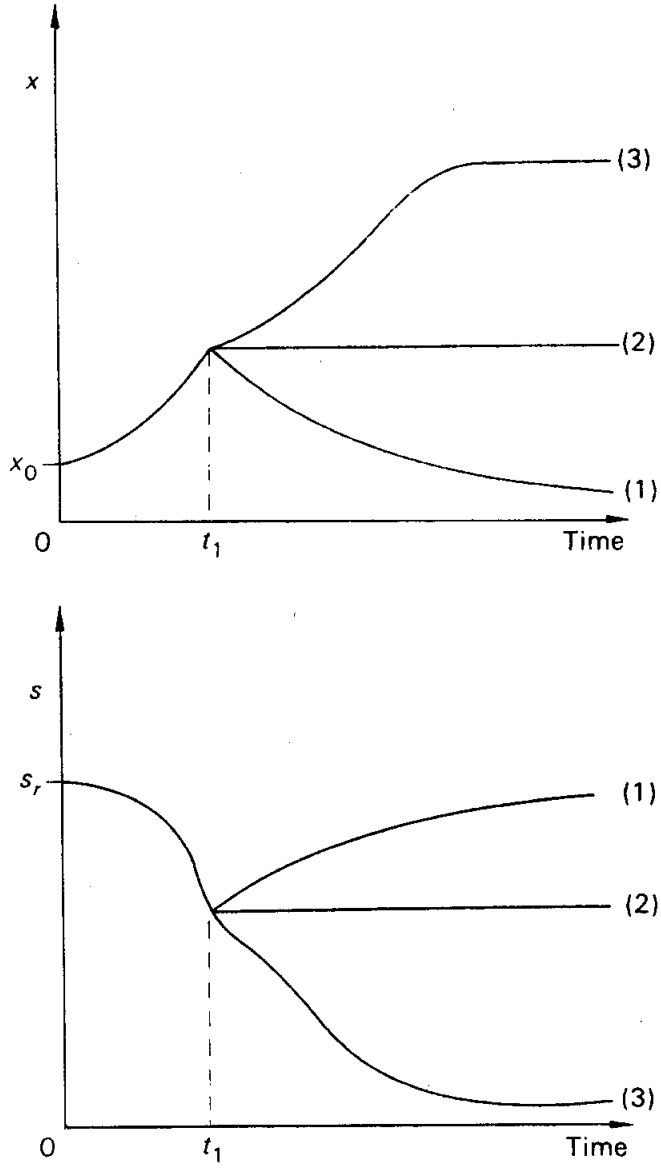
รูปที่ 5.1 The chemostat (diagrammatic). The biomass and growth-limiting substrate concentrations at different points are represented by x and s respectively; F=flow rate; V=culture volume.

ระบบการไหลผ่านถูกใช้เพื่อกระตุ้นเชื้อจุลินทรีย์ในระบบเก็บกักแต่ไม่มีการควบคุมสิ่งแวดล้อมใด ๆ หลักการสำคัญของการหมักแบบคงที่ทางเคมีเพิ่งปรากฏขึ้นภายหลังจากที่ Monod (1950) และ Novick Szilard (1950) ได้บัญญัติทฤษฎีพื้นฐานขึ้นมา ทฤษฎีนี้ในขั้นแรกได้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะครึ่งให้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ(spceific growth rate) ของชีวมวลอยู่ที่ค่าใดค่าหนึ่งได้ตั้งแต่ศูนย์ไปจนถึงสูงสุด ข้อสรุปนี้ได้ทำลายความคิดซึ่งเป็นประเพณีกันขวางที่ยังไม่ได้มีการพิสูนจ์ว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตคงที่คืออัตราสูงสุดซึ่งตรงกันกับระยะเวลาในการทวีคูณ(doubling time) ของการหมักแบบเก็บกักอย่างง่าย การหมักแบบคงที่ทางเคมีได้ขยายขอบเขตทางวิชาการด้านสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ (microbial physiology) ให้กว้างขวางยิ่งขึ้นและประวัติของวิธีการนี้ยังได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญอย่างเอกอุต่อพัฒนาการทางทฤษฎีก่อนการทดลอง วิธีการหมักแบบคงที่ทางเคมียังสามารถใช้ได้กับจุลินทรีย์พวกโปรติสต์ทุกรูปแบบและเซลล์เนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ชั้นสูงที่สามารถเจริญเติบโตเป็นเชื้อจมอันหนึ่งอันเดียวกัน(homogeneous submerged culture) ได้

5.2 ทฤษฎีการหมักแบบคงที่ทางเคมี

5.2.1 หลักการโดยทั่วไป

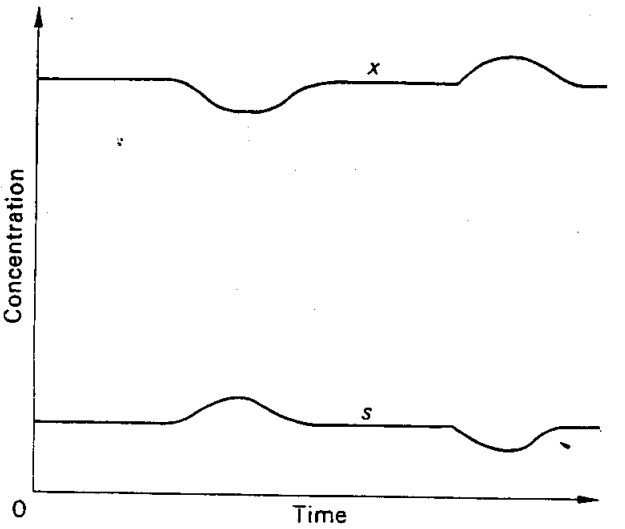
การหมักแบบคงที่ทางเคมีดังรูปที่ 5.1 ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งถูกเติมด้วยสื่อกลางอาหารใหม่ลงไปอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราความเร็วคงที่และปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์จะถูกรักษาไว้ให้คงที่โดยการกำจัดออกอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกัน โดยอุดมการณ์แล้วการผสมกันจะต้องเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แบบคือ เมื่อหนึ่งหยดของสื่อกลางอาหารเข้าไปในภาชนะหมักซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์บรรจุอยู่จะต้องกระจายไปอย่างสม่ำเสมอโดยทันทีทันใดตลอดทั้งเชื้อนี้ ในทางปฏิบัติเพื่ออุดมการณ์นี้หมายความว่าระยะเวลาที่ต้องใช้เพื่อผสมสื่อกลางอาหารปริมาตรเพียงเล็กน้อยกับเชื้อจุลินทรีย์จะต้องน้อยมากเมื่อเทียบกับระยะเวลาแทนที่(t_r replacement time) ซึ่ง $t_r = V/F$, V = ปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ และ F = อัตราการไหลของสื่อกลางอาหาร



รูปที่ 5.2 The three possible outcomes of a chemostat culture in which growth rate of the biomass (x) is limited by the concentration of the growth-limiting nutrient (s). The flow of medium containing growth-limiting nutrient at concentration s_r is started at time, t_1. The different cases are: (1) rate of wash out of biomass exceeds maximum growth-rate; (2) rate of wash out of biomass = maximum growth rate; (3) initial rate of wash out is less than maximum growth rate of biomass.

เมื่อพิจารณาถึงการเจริญเติบโตของชีวมวลซึ่งถูกกำหนดจำกัดโดยปริมาณของซับสเตรตเพียงชนิดเดียวแต่สารอาหารอย่างอื่นทั้งหมดที่จำเป็นถูกทำให้มีปริมาณซึ่งมากเกินพอ สมมุติว่าเมื่อเริ่มต้นการหมักเชื้อจุลินทรีย์ถูกปล่อยให้เป็นแบบเก็บกักโดยไม่มีการเติมสื่อกลางอาหารใหม่ลงไปแล้วต่อมาจึงเริ่มป้อนสื่อกลางอาหารใหม่ให้ไหลเข้าไปผลลัพธ์ที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์อาจเป็นไปได้หนึ่งในสามวิถีทางดังแสดงในรูปที่ 5.2 วิถีทางแรกคืออัตราความเร็วในการที่ถูกล้างออกไปหรือไหลออกไป (washout) ของชีวมวลจะมากเกินกว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จนกระทั่งความเข้มข้นของชีวมวลลดลงและความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตมีค่าสูงขึ้นเข้าใกล้กับความเข้มข้นของซับสเตรตในสื่อกลางอาหารใหม่ที่เติมเข้าไป s_r วิถีทางที่สองคืออัตราความเร็วในการล้างออกไปของชีวมวลเมื่อเริ่มต้นสมดุลย์กันแน่นอนกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต นั่นก็คือจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตด้วยอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะสูงสุด (μ_m) ในกรณีเช่นนี้จะเกิดสภาวะมั่นคงหรือสมดุลย์ (steady state) คือความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตมีความคงที่ อย่างไรก็ตามสภาวะความมั่นคงเช่นนี้อาจไม่ถาวร เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงในบางขณะของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรตทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาต่อความเข้มข้นต่าง ๆ เหล่านี้ วิถีทางที่สามอาจเกิดขึ้นถ้าอัตราความเร็วในการล้างออกไปของชีวมวลเมื่อเริ่มต้นน้อยกว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุด กรณีเช่นนี้ความเข้มข้นของชีวมวลจะเพิ่มขึ้นต่อไปแต่อย่างไรก็ตามในท้ายที่สุดความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตก็จะลดลงและมีผลทำให้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะลดลงด้วย จนกระทั่งอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของชีวมวลเท่ากันกับอัตราความเร็วในการล้างออกไป ดังนั้นจึงทำให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตอีกต่อไป ในกรณีนี้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของชีวมวลจะน้อยกว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะสูงสุด $<\mu_m$ และถูกกำหนดโดยอัตราการไหลของสื่อกลางอาหาร ภาวะมั่นคงเช่นนี้เป็นการควบคุมตัวเองอย่างหนึ่ง ผลลัพธ์จากการรบกวนชั่วครั้งชั่วคราวต่อสภาวะมั่นคงได้ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 5.3 การตกต่ำลงในความเข้มข้นของชีวมวลจะร่วม

ด้วยกับการสูงขึ้นในความเข้มข้นของซับสเตรตซึ่งจะเพิ่มอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต และจะกระทำต่อเนื่องไปจนกระทั่งสภาวะมั่นคงถูกรักษาไว้ได้อีก ส่วนการสูงขึ้นในความเข้มข้นของชีวมวลก็จะมีผลในทางตรงกันข้าม



รูปที่ 5.3 Effects of temporary disturbances of steady-state conditions in a chemostat when the specific growth rate of the biomass is less than the maximum rate; x = biomass concentration; s = substrate concentration.

5.2.2 อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ (SPECIFIC GROWTH RATE)

วัตถุประสงค์ของทฤษฎีเชิงปริมาณคือการทำนายค่าของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตกับความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรตภายใต้สภาวะซึ่งแตกต่างกัน ถ้าให้ μ = อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ และสัญญาลักษณ์สำหรับตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์อื่น ๆ ที่ให้ไว้ดังในรูปที่ 5.1 ค่าของ $F/V = D$ คือค่าอัตราความเร็วในการเจือจาง (dilution rate) หมายถึงอัตราความเร็วในการไหลผ่านต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร

การเพิ่มขึ้นของชีวมวลถูกกำหนดโดยความสมดุลย์ของชีวมวล (biomass balance) คือ

การเพิ่มขึ้นสุทธิของชีวมวล = การเจริญเติบโต − ส่วนที่ออกไป

ในช่วงระยะเวลาซึ่งสั้นมาก (dt) ความสมดุลย์สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดคือ

$$V.dx = V.\mu x.dt - Fx.dt \qquad 5.1$$

หารสมการที่ 5.1 ตลอดด้วย $V.dt$ จะได้ว่า

$$dx/dt = (\mu - D)x \qquad 5.2$$

เมื่ออยู่ในสภาวะมั่นคงหรือสมดุลย์ $dx/dt = 0$ ดังนั้น $\mu = D$

5.2.3 ความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรทที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต

ความสมดุลย์สำหรับซับสเตรทที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตคือ

การเพิ่มสุทธิ = ส่วนที่เข้ามา − ส่วนที่ออกไป − ส่วนที่ใช้เพื่อการเจริญเติบโต

สำหรับช่วงระยะเวลาซึ่งสั้นมาก (dt) ความสมดุลย์สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด คือ

$$V.ds = F.s_r.dt - Fs.dt - V.\mu x.dt/Y \qquad 5.3$$

ในที่นี้ Y คือ ผลิตผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต (growth yield) หารสมการที่ 5.3 ตลอดด้วย $V.dt$ แล้วแทนค่า F/V เป็น D จะได้ว่า

$$ds/dt = D(s_r - s) - \mu x/Y \qquad 5.4$$

เมื่ออยู่ในสภาวะมั่นคงหรือสมดุลย์ $dx/dt = ds/dt = 0$ ดังนั้นค่าของ x และ s ที่สภาวะมั่นคงจึงถูกกำหนดได้จากสมการที่ 5.2 และ 5.4 เป็น

$$(\mu - D)\tilde{x} = 0 \qquad 5.5$$

และ

$$D(s_r - \tilde{s}) - \mu\tilde{x}/Y = 0 \qquad 5.6$$

$\tilde{x}$ และ $\tilde{s}$ หมายถึงค่าของ x และ s ที่สภาวะมั่นคง ค่าของ $\tilde{s}$ อาจคำนวนได้จากสมการที่ 2.21 คือ

$$\mu = \mu_m s/(s + K_s) \qquad 5.7$$

แทนค่า $\mu = D$ ในสมการที่ 5.7 จะได้สมการที่สภาวะมั่นคงหรือสมดุลย์เป็น

$$\tilde{s} = K_s D/(\mu_m - D) \qquad 5.8$$

และค่าของ $\tilde{x}$ อาจคำนวนได้จากสมการที่ 5.6 โดยแทนค่า $\mu = D$ จะได้ว่า

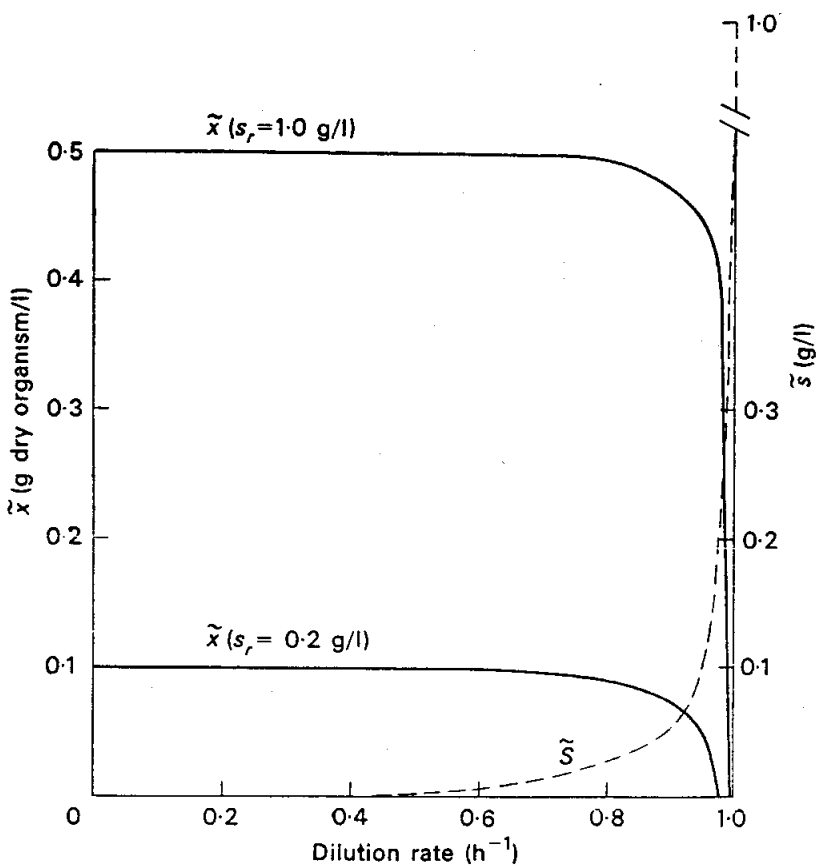
$$\tilde{x} = Y(s_r - \tilde{s}) = Y\{s_r - K_s D/(\mu_m - D)\} \qquad 5.9$$

5.2.4 อัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤต (CRITICAL DILUTION RATE)

เมื่อ $\tilde{s}=s_r$ จะทำให้ได้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุด แทนค่า $\tilde{s}$ ลงในสมการที่ 5.7 จะได้ว่า

$$\mu = D_c = \mu_m s_r/(s_r+K_s) \qquad 5.10$$

D_c คืออัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤต ที่ค่านี้มีผลทำให้ความเข้มข้นของชีวมวลในสภาวะมั่นคง $\tilde{x}$ มีค่าเท่ากับศูนย์ จากสมการที่ 5.10 ถ้า $s_r \gg K_s$ จะได้ว่า $D_c \approx \mu_m$ ความสัมพันธ์ระหว่าง $\tilde{x}$ และ $\tilde{s}$ ต่ออัตราความเร็วในการเจือจางได้แสดงไว้ในรูปที่ 5.4



รูปที่ 5.4 Steady-state values of biomass ($\tilde{x}$) and growth-limiting substrate ($\tilde{s}$) concentrations in a chemostat according to Eqn 5.8 and 5.9. *Parameters:* $\mu_m = 1{\cdot}0\ h^{-1}$; $K_s = 0{\cdot}005$ g/l; $Y = 0{\cdot}5$.

5.2.5 การตรวจสอบหาค่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุด

เมื่อ $s \gg K_s$ ก็จะสามารถกำหนดให้ μ ในสมการที่ 5.2 เท่ากับ μ_m ได้แล้วอินทีเกรตตามหลักวิชาคณิตศาสตร์จะได้สมการเป็น

$$\ln x = (\mu_m - D)t + \ln x_0 \qquad 5.11$$

ถ้าทำให้ $D > D_c$ ในการหมักแบบคงที่ทางเคมี ชีวมวลของเชื้อจุลินทรีย์จะลดลงหรือถูกล้างออกไปตามสมการที่ 5.11 และมีความลาดชัน (slope) ของเส้นกราฟแบบลอการิทึมิกเท่ากับ $(\mu_m - D)$ จึงทำให้คำนวนหาค่า μ_m ที่แน่นอนได้เมื่อทราบค่าของ D วิธีการนี้ได้ถูกใช้โดย Pirt และ Callow (1960) เพื่อตรวจสอบผลของอุณหภูมิต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงของเชื้อรา Penicillium chrysogenum

5.3 อัตราการออกไปของชีวมวลในการหมักแบบคงที่ทางเคมี

5.3.1 การตรวจสอบ

สำหรับการหมักแบบคงที่ทางเคมี อัตราความเร็วในการออกไปของชีวมวลต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ถูกกำหนดโดย $R = Dx$ เมื่อแทนค่า x ในสมการที่ 5.9 จะได้ค่า R ที่สภาวะมั่นคงดังสมการที่ 5.12

$$R = DY\{s_r - K_s D/(\mu_m - D)\} \qquad 5.12$$

อัตราความเร็วในการออกไปภายใต้สภาวะมั่นคงซึ่งเป็นฟังชั่นของ D พร้อมด้วยค่าตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์ตามแบบฉบับต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 5.5 อัตราความเร็วในการออกไปของชีวมวล (R) ถึงจุดสูงสุดที่อัตราความเร็วในการเจือจางเท่ากับ D_m จึงอาจคำนวนหาค่า D_m ได้โดยการดิฟเฟอเรนชิเอต R ให้เกี่ยวเนื่องกับ D คือ dR/dD แล้วกำหนดให้เท่ากับศูนย์ ค่าของ D ที่ได้คือ D_m ดังสมการที่ 5.13

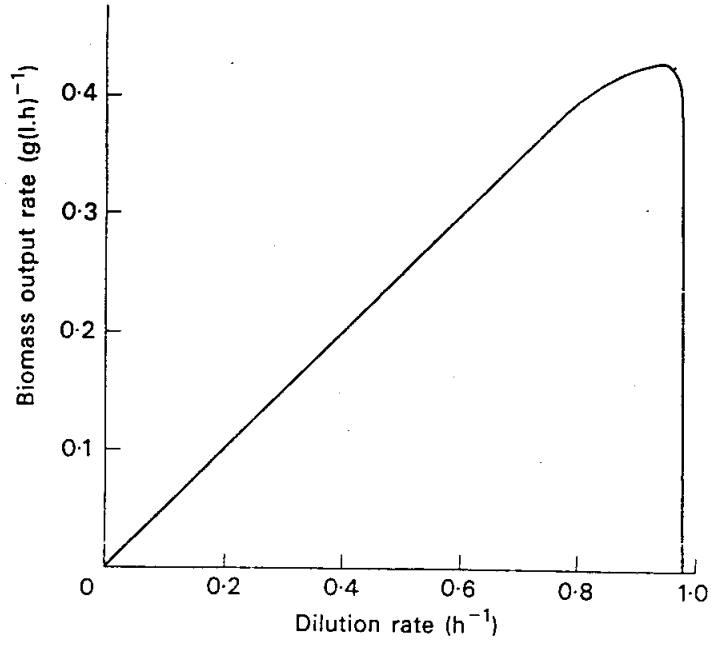
$$D_m = \mu_m \left\{ 1 - \left(\frac{K_s}{s_r + K_s} \right)^{1/2} \right\} \qquad 5.13$$

แทนค่าในสมการที่ 5.9 จะได้ค่าความเข้มข้นของชีวมวลภายใต้สภาวะมั่นคงที่ D_m ดังสมการที่ 5.14

$$\tilde{x}_m = Y[s_r + K_s - \{K_s(s_r + K_s)\}^{1/2}] \qquad 5.14$$

ถ้า $s_r \gg K_s$ ก็จะได้ค่าอัตราความเร็วสูงสุดในการออกไปของชีวมวล (R_m) ดังสมการที่ 5.15

$$D_m \tilde{x}_m \approx D_m Y s_r \qquad 5.15$$



รูปที่ 5.5 Steady-state rates of biomass output in a chemostat. Parameters as for Fig. 5.4, $s_r = 1{\cdot}0$ g/l.

5.3.2 เมื่อเปรียบเทียบกับการออกไปของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบเก็บกัก

เหมือนดังเป็นผลลัพธ์อันเนื่องมาจากการเร่งโดยอัตโนมัติ (autocatalysis) อัตราความเร็วสูงสุดในการออกไปของชีวมวลภายใต้การหมักคงที่ทางเคมีจะสูงกว่าการหมักแบบเก็บกักที่ปริมาตรเดียวกันดังแสดงในรูปที่ 5.6 ความลาดชันของเส้นกราฟ A และ B หมายถึงอัตราความเร็วสูงสุดในการออกไปของชีวมวล การหมักแบบคงที่ทางเคมีสามารถกระทำได้อย่างต่อเนื่อง ณ.จุดที่มีอัตราการเกิดชีวมวลสูงสุดของเส้นกราฟการเจริญเติบโต (slope B) ส่วนอัตราความเร็วในการออกไปของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบเก็บกักถูกกำหนดโดยอัตราความเร็วเฉลี่ยทั้งหมดในการเกิดชีวมวล (slope A) ตลอดช่วงระยะทาง ๆ ทั้งหมดของการเจริญเติบโต

อัตราความเร็วในการออกไปของชีวมวลอาจถูกเปรียบเทียบได้ในเชิงปริมาณดังต่อไปนี้ ถ้าให้ x_m= ความเข้มข้นสูงสุดของชีวมวล x_0= ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อจุลินทรีย์และให้ถือว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบเก็บกักยังคงอยู่ที่จุดสูงสุด (μ_m) จนกระทั่งซับสเตรตถูกทำให้หมดไป ดังนั้นจึงคำนวนหาช่วงระยะเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบเก็บกัก(t_c) ได้โดยอาศัยรากฐานจากสมการที่ 2.5 ดังสมการที่ 5.16

$$t_c = \frac{1}{\mu_m} \cdot \ln\left(\frac{x_m}{x_0}\right) + t_a \qquad 5.16$$

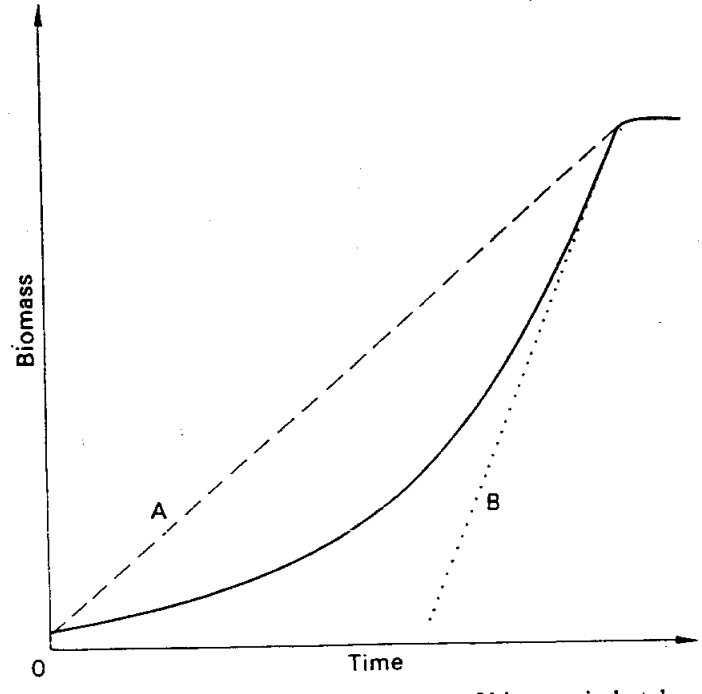
t_a หมายถึงระยะเฉื่อยชาซึ่งประกอบด้วยระยะเวลาล้าหลัง(lag period) ต่าง ๆ และระยะเวลาที่ต้องใช้เพื่อการถ่ายเทและบรรจุลงสู่ภาชนะหมักระหว่างครบรอบการหมัก การเพิ่มขึ้นของชีวมวลจะเท่ากับ Ys_r ซึ่ง s_r คือความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต ดังนั้นอัตราความเร็วในการออกไปของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบเก็บกักอาจคำนวนได้ดังสมการที่ 5.17 โดยแทนค่าของ t_c ด้วยสมการที่ 5.16

$$R_{m(\text{batch})} = Ys_r/t_c = \mu_m Ys_r/\left\{\ln\left(\frac{x_m}{x_0}\right) + \mu_m t_a\right\} \qquad 5.17$$

เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราความเร็วสูงสุดในการออกไปของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีคือสมการที่ 5.15 โดยถือว่า $D_m = \mu_m$ จะได้ว่า

$$\frac{R_{m(\text{chemostat})}}{R_{m(\text{batch})}} = \ln\left(\frac{x_m}{x_0}\right) + \mu_m t_a = \ln\left(\frac{x_m}{x_0}\right) + \frac{0{\cdot}693 t_a}{t_d} \qquad 5.18$$

t_d คือระยะเวลาในการหวีคูณ $t_d = 0{\cdot}693/\mu_m$. ในทางปฏิบัติอัตราส่วน $x_m : x_0$ มักเป็น 10 หรือมากกว่าจึงทำให้อัตราความเร็วสูงสุดในการออกไปของชีวมวลภายใต้การหมักแบบคงที่ทางเคมีมีค่าอย่างน้อยเป็น 2.3 เท่าของอัตราความเร็วในการออกไปของเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบเก็บกักและถือว่า $t_a = 0$ อย่างไรก็ตาม t_a ปกติมักมีค่าเป็นหลายเท่าของ t_d



รูปที่ 5.6 Comparison of the maximum output rates of biomass in batch and chemostat cultures. The curve represents the growth of a batch culture and the biomass output rate is given by the slope of the broken line, A. A chemostat culture can maintain the output rate given by the maximum slope on the curve (dotted line, B).

5.4 ลักษณะการกระจายหรือแจกแจงของค่าระยะเวลาคงอยู่ภายใต้การหมักแบบคงที่ทางเคมี

(DISTRIBUTION OF RESIDENCE TIME IN A CHEMASTAT)

เนื่องจากมีการผสมปนเปกันอย่างทั่วถึงส่วนต่าง ๆ ของสื่อกลางอาหารที่เติมลงไปบางส่วนอาจออกไปจากถังหมักอย่างทันทีทันใดหรือตกค้างอยู่อย่างไม่มีสิ้นสุด ดังนั้นจึงมีลักษณะการกระจายของค่าระยะเวลาคงอยู่ของส่วนต่าง ๆ ในการหมักนี้โดยที่แต่ละส่วนมีช่วงระยะเวลาคงอยู่ไม่เท่ากัน ถ้าให้ m_0 = ปริมาณของสารต่อหน่วยปริมาตรที่ปรากฏเมื่อเวลาเริ่มต้น (t_0) และ m = ปริมาณที่ปรากฏเมื่อเวลา t ดังนั้นปริมาณของสารที่ออกจากภาชนะหมักหรือปริมาณของสารซึ่งมีช่วงระยะเวลาคงอยู่(residence time)

ระหว่าง t ถึง $t+dt$ จึงเป็น

$$-dm = Dm.dt \qquad 5.19$$

ถ้าให้ $-dm/m_0 = df$ เป็นเศษส่วน(fraction) ส่วนหนึ่งของสารเริ่มต้นซึ่งมีช่วงระยะเวลาคงอยู่ระหว่าง t ถึง $t+dt$ ดังนั้นเมื่อแทนค่าลงในสมการที่ 5.19 จะได้ว่า

$$df = D\frac{m}{m_0}dt \qquad 5.20$$

เนื่องจาก $-dm/dt = Dm$ ดังสมการที่ 5.19 ถ้าอินตีเกรตแล้วถอดค่าลอคออกตามหลักวิชาคณิตศาสตร์จะได้ว่า $m/m_0 = e^{-Dt}$ แล้วแทนค่า m/m_0 ลงในสมการที่ 5.20 จะได้ว่า

$$df = D\,e^{-Dt}\,dt \qquad 5.21$$

ดังนั้น เศษส่วนจำนวนของสาร (f) ซึ่งมีช่วงระยะเวลาคงอยู่ระหว่าง t_1 ถึง t_2 คือ

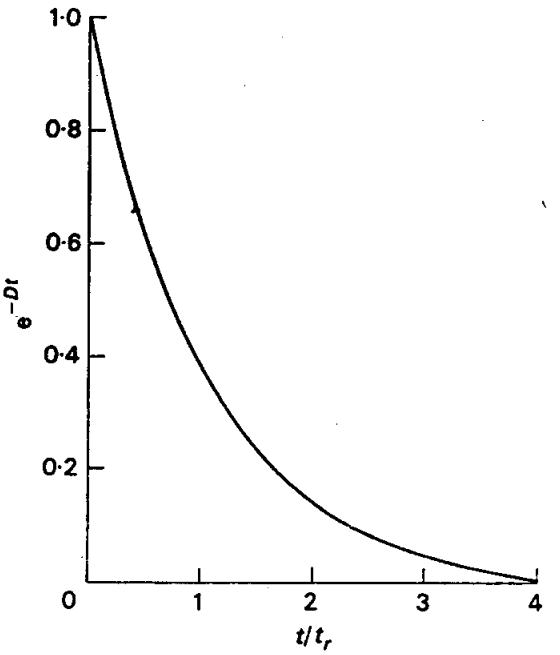
$$f = \int_{t_1}^{t_2} D\,e^{-Dt}\,dt \qquad 5.22$$

ฟังชั่น $D\,e^{-Dt} = df/dt$ หมายถึงการกระจายหรือแจกแจงของค่าระยะเวลาคงอยู่ต่าง ๆ

ลักษณะการกระจายหรือแจกแจงของค่าระยะเวลาคงอยู่อาจถูกตรวจสอบได้จากการทดลองโดยฉีดสารซึ่งมีสีปริมาตรเพียงเล็กน้อยลงไปในภาชนะหมักแล้วรวบรวมของเหลวที่ออกมาเป็นส่วนย่อยเท่า ๆ กันที่ระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อลากเส้นกราฟของปริมาณสีในส่วนย่อยต่าง ๆ กับเวลาจะได้ลักษณะการกระจายหรือแจกแจงของช่วงระยะเวลาคงอยู่ ลักษณะการกระจายหรือแจกแจงของช่วงระยะเวลาคงอยู่ที่ได้จากการหมักแบบคงที่ทางเคมีดังรูปที่ 5.7 แตกต่างจากการกระจายหรือแจกแจงแบบGaussian ที่ได้จากการหมักแบบปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์ไหลผ่าน (plug-flow fermentation) ดังรูปที่ 4.4 ดังนั้นลักษณะการกระจายหรือแจกแจงของช่วงระยะเวลาคงอยู่จึงเป็นลักษณะประจำของการหมักแต่ละแบบ

เมื่ออินตีเกรตสมการที่ 5.22 จะได้ว่า

$$f = e^{-Dt_1} - e^{-Dt_2} \qquad 5.23$$



รูปที่ 5.7 Fraction (e^{-Dt}) of initial material remaining in a chemostat after the elapse of different multiples of the replacement time (t_r); t = time.

ดังนั้น เศษส่วนจำนวนของสาร (f) ซึ่งมีช่วงระยะเวลาคงอยู่ระหว่าง 0 ถึง t จึงเป็น $e^{0}-e^{-Dt}$ หรือ $1-e^{-Dt}$ ในที่นี้ e^{-Dt} หมายถึงค่าเศษส่วนจำนวนของสารเริ่มต้นที่ยังเหลือตกค้างอยู่เมื่อเวลา t และอาจจะคำนวนได้ว่าค่าเศษส่วนจำนวนของสารเริ่มต้นที่ยังเหลือตกค้างอยู่ภายหลังจากครบกำหนด 1, 2, 3 และ 4 รอบของช่วงระยะเวลาแทนที่(replacement time) หรือช่วงระยะเวลาคงอยู่ คือ 0.367, 0.135, 0.050 และ 0.015 ตามลำดับ ส่วนจำนวนของสารที่มีช่วงระยะเวลาคงอยู่ซึ่งมากกว่า t คือ จาก t ถึง ∞ จะเป็น e^{-Dt} หรือ $e^{-Dt}-e^{-D\infty}$ แต่เนื่องจาก $e^{-D\infty}$ มีค่าน้อยมากหรือเกือบเท่ากับศูนย์จึงตัดทิ้งได้ ค่าระยะเวลาคงอยู่โดยเฉลี่ย (mean residence time) ของทุกส่วนในสื่อกลางอาหารจะเท่ากับ $1/D$ หรือ V/F

5.5 การเปลี่ยงเบนจากหลักการหมักแบบคงที่ทางเคมี

5.5.1 การทดสอบความเปลี่ยงเบน

รูปแบบของเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างชีวมวลและซับสเตรทที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตกับอัตราความเร็วในการเจือจางเป็นองค์ประกอบสำคัญในการ

ตรวจสอบดูความสอดคล้องกันกับทฤษฎี การทดลองซึ่งเข้ากันได้เป็นอย่างดีกับทฤษฎีอย่างง่ายถูกแสดงโดยการเจริญเติบโตของ Klebsiella aerogenes ซึ่งถูกกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตด้วยแอมโมเนียไอออนที่ให้ไว้ในสื่อกลางสารอาหารขั้นต่ำ (minimal) ของ glycerol salts medium ในระบบต่าง ๆ หลายระบบมีการเบี่ยงเบนไปจากทฤษฎีอย่างง่ายและถือว่าการเบี่ยงเบนเหล่านี้เป็นวิธีการพื้นฐานเพื่อตรวจสอบดูว่าชีวมวลมีปฏิกริยาต่อสิ่งแวดล้อมของตนอย่างไร

ได้มีการเสนอว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตไม่ได้ถูกกำหนดจำกัดด้วยความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตแต่เพียงอย่างเดียวแต่จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของชีวมวลด้วย (Contois, 1959) การเบี่ยงเบนไปจากทฤษฎีเช่นนี้อาจเขียนเป็นสมการได้ว่า $K_s = Bx$ ซึ่ง x คือความเข้มข้นของชีวมวลและ B คือค่าคงที่จากการทดลอง หลักฐานสำหรับการเบี่ยงเบนไปจากทฤษฎีเช่นนี้ยังเป็นที่สงสัยเนื่องจากขึ้นอยู่กับการคำนวนความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดการเจริญเติบโตโดยถือว่าพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนคงที่ แต่โดยทั่วไปโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูงของซับสเตรตมักพบว่ามีพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตลดลง (Pirt, 1959) อย่างไรก็ตามการเบี่ยงเบนนี้อาจถือได้ว่าเป็นข้อสังเกตุอย่างหนึ่ง

การเบี่ยงเบนบางอย่างอาจมีสาเหตุมาจากการมีสิ่งกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโต (บทที่ 17) การเบี่ยงเบนที่มักพบเห็นอยู่เสมอคือการมีพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตไม่คงที่ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต การเบี่ยงเบนเช่นนี้เป็นผลเนื่องมาจากพลังงานที่ใช้เพื่อการทำนุบำรุง (maintenance energy) ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไปในตอนที่ 8.3 การเบี่ยงเบนอย่างอื่นซึ่งเป็นผลกระทบเนื่องมาจากบทบาทของสารอาหารแตกต่างกันจะได้กล่าวถึงในบทที่ 12

5.5.2 ผลกระทบเนื่องจากการผสมกันอย่างไม่สมบูรณ์

การผสมปนเปกันเป็นอย่างดีในการหมักแบบคงที่ทางเคมีหมายถึง เมื่อเติมสารปริมาณเพียงเล็กน้อยลงไป ระยะเวลาซึ่งใช้ทำให้สารนั้นกระจายเป็นเนื้อเดียวกันตลอดทั้ง

ระบบการหมักควรจะสั้นมากเมื่อเทียบกับระยะเวลาคงอยู่โดยเฉลี่ย (mean residence time) หรือ $1/D$

สำหรับเครื่องมือในขั้นการทดลองด้วยภาชนะหมักเพียงไม่กี่ลิตรการผสมปนเปกันเกือบสมบูรณ์อาจถูกทำได้ด้วยการกวนหรือคนอย่างธรรมดาจนกว่าภาชนะหมักจะมีโพรงหรือรูเกิดขึ้นทำให้เชื้อจุลินทรีย์แยกตัวออกจากการกวนหรือคน ชีวมวลจะเกาะติดกับผิวของภาชนะหรือกลายเป็นชั้นเหนียวมากขึ้น (ตอนที่ 10.2)

ถ้ามีการผสมกันอย่างไม่สมบูรณ์จะมีที่ว่างเกิดขึ้นในภาชนะทำให้อัตราความเร็วในการเจือจางอาจมากหรือน้อยกว่าอัตราความเร็วในการเจือจางเฉลี่ย (D) ซึ่งถูกให้ไว้เป็น F/V หมายความว่าอัตราความเร็วในการเจือจางที่จุดต่าง ๆ ในภาชนะมีการแจกแจงออกไปโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ D ผลลัพธ์ที่ตามมาเมื่อ D สูงขึ้นจนถึงค่าวิกฤต D_c ก็จะทำให้มีบางจุดในภาชนะมีค่า $D < D_c$ และภาวะมั่นคงก็อาจเกิดขึ้นได้แม้แต่เมื่อ $D > D_c$ การเปลี่ยงเบนไปจากทฤษฎีเช่นนี้ถูกเรียกว่า "ผลกระทบจากเครื่องมือ" (apparatus effect)

5.5.3 การเจริญเติบโตแบบเกาะติดกับผนัง (WALL GROWTH)

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเกาะติดกับผิวแก้วหรือโลหะได้ และการหมักแบบไหลต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนานก็อาจมีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เกาะติดตามด้านข้างของผนังได้ การเจริญเติบโตตามด้านข้างของผนังอาจมีลักษณะเป็นเยื่อบางของชีวมวลไปจนถึงเป็นชั้นหนาบนผิวของภาชนะ

ผลกระทบจากการเจริญเติบโตที่เกาะติดกับผนังถูกเสนอเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (Topiwala & Hamer, 1971) ได้ดังต่อไปนี้

ให้ $\tilde{x}$ = ความเข้มข้นของชีวมวลแขวนลอยภายใต้สภาวะมั่นคง x_w = ปริมาณชีวมวลที่เจริญเติบโตตามผิวหรือผนังต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของเชื้อ ภายใต้ภาวะมั่นคงความสมดุลย์ระหว่างชีวมวลกับซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตคือ

$$D\tilde{x} = \mu\tilde{x} + \mu\tilde{x}_w \qquad 5.24$$

และ

$$D(s_r - \tilde{s}) = (\mu\tilde{x} + \mu x_w)/Y \qquad 5.25$$

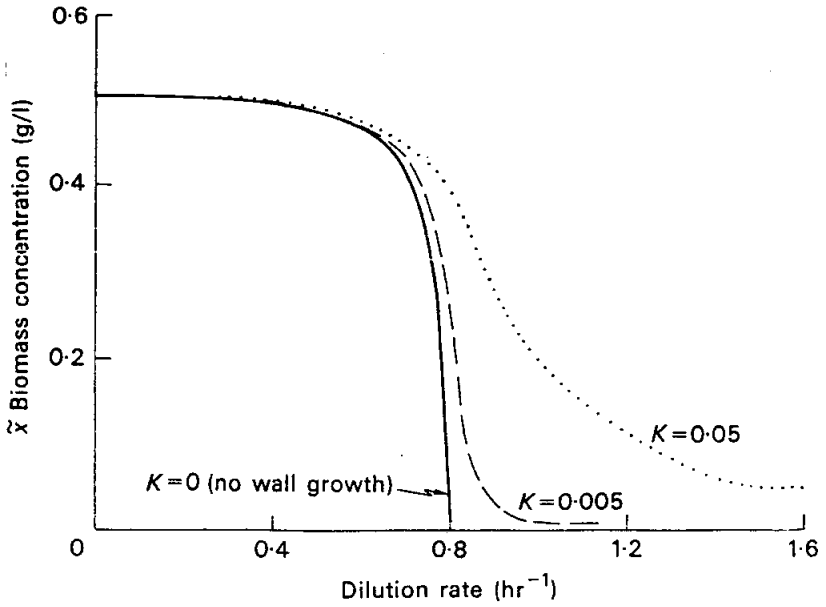
จากสมการที่ 5.24 และ 5.25 จะได้ว่า

$$\tilde{x} = Y(s_r - \tilde{s}) \qquad 5.26$$

แทนค่าสำหรับ $\tilde{x}$ ในสมการที่ 5.25 และ $\mu = \mu_m s/(s+K_s)$ จะได้ว่า

$$\frac{\mu_m \tilde{s}}{\tilde{s}+K_s} = \frac{DY(s_r-\tilde{s})}{Y(s_r-\tilde{s})+x_w} \qquad 5.27$$

สมการที่ 5.27 เป็นสมการที่มีกำลังสองของ s อย่างไรก็ตามเมื่อ $D<\mu_m$ จะใช้ราก (root) ที่มีค่าเป็นบวกเท่านั้น ส่วนอีกรากหนึ่งซึ่งมีค่าเป็นลบจะไม่ใช้ในการพิจารณา ผลกระทบจากการเจริญเติบโตตามด้านข้างผนังต่อความเข้มข้นของชีวมวลภายใต้สภาวะมั่นคงได้แสดงไว้ในรูปที่ 5.8



รูปที่ 5.8 The effect of wall growth on the steady-state biomass concentration in a chemostat culture (from Topiwala & Hamer, 1971); Y=0·5, μ_m=0·8 h^{-1}, s_r= 1·0 g/l, K_s=0·02 g/l, $K=x_w$ (g/l).

เพื่อรักษาสภาวะที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกันเอาไว้ให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการหมักแบบคงที่ทางเคมี การเจริญเติบโตตามด้านข้างผนังจะต้องถูกทำให้มีน้อยที่สุด การคนหรือกวนอย่างรุนแรงอาจป้องกันการเจริญเติบโตตามด้านข้างของผนังได้แต่เชื้อจุลินทรีย์ที่กระเด็นขึ้นมาอาจเป็นสาเหตุทำให้ชีวมวลเกาะติดพอกพูนอยู่บนผนังเหนือระดับของเหลวได้ การเกาะติดของชีวมวลกับข้างผนังอาจถูกป้องกันได้อย่างชั่วคราว

โดยใช้ไซลิโคนทาตามผิวของภาชนะ เทฟลอน (Teflon) อาจช่วยให้พื้นผิวของผนังไม่ยึดเหนี่ยวชีวมวลของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างถาวรแต่ก็ใช้ได้อย่างจำกัดในการทำเป็นท่อเทฟลอนและปลอกเทฟลอนหุ้มแท่งอุปกรณ์ตรวจสอบ (probe) ต่าง ๆ เท่านั้น การใช้เทฟลอนเคลือบพื้นผิวของภาชนะหมักทั้งหมดยังใช้ไม่ได้ผลอย่างเป็นที่น่าพอใจ

5.6 การเปลี่ยนแปลงระดับอัตราความเร็วในการเจือจาง

ช่วงระยะเวลาที่ต้องการเพื่อรอให้ถึงสถานะมั่นคงใหม่อีกครั้งหนึ่งหลังจากที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของอัตราความเร็วในการเจือจางจาก D_1 เป็น D_2 อาจถูกคำนวณได้อย่างคร่าว ๆ จากสมการที่ 5.4 โดยกำหนดให้ $(s_r - \bar{s}) \approx s_r$, $x/Y \approx s_r$ และ $\mu = \mu_a$ ซึ่ง $\mu_a \approx (D_1 + D_2)/2$ ดังนั้นจึงได้ว่า

$$ds/dt \approx (D_2 - D_1)s_r/2 \qquad 5.28$$

และระยะเวลาที่ต้องการเพื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นที่สถานะมั่นคงของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตจาก s_1 ไปเป็น s_2 ถูกกำหนดโดย $2(s_2 - s_1)/(D_2 - D_1)s_r$ จากสูตรโดยประมาณเช่นนี้แสดงให้เห็นว่าสำหรับขบวนการต่าง ๆ ซึ่ง $\bar{s} \ll s_r$ ระยะเวลาที่ต้องใช้เพื่อปรับค่า x และ s ให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงอัตราความเร็วในการเจือจางจะเป็นเพียงเศษส่วนย่อยส่วนหนึ่งของระยะเวลาในการทวีคูณของชีวมวลเท่านั้น Mateles และคณะ (1965) ได้ศึกษาถึงระยะเวลาการตอบสนองของเชื้อ Escherichia coli ที่ถูกกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตด้วยแอมโมเนียต่อการเปลี่ยนแปลงระดับอัตราความเร็วในการเจือจาง พบว่าไม่มีนัยสำคัญสำหรับการเปลี่ยนแปลงในช่วง 0.1 h^{-1} แต่เมื่อ D ถูกทำให้เพิ่มขึ้นถึงระดับ 0.4 h^{-1} ระยะเวลาที่ต้องใช้เพื่อการปรับปรุงตัวจะประมาณเป็นสามเท่าของระยะเวลาทวีคูณ สิ่งนี้แสดงว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถปรับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของตนให้เข้ากับความเข้มข้นของซับสเตรตที่สูงขึ้นอย่างมากมายได้โดยไม่มีระยะล้าหลัง การล้าหลังเช่นนี้เป็นผลสืบเนื่องมาจากระยะเวลาที่ต้องการสำหรับจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างต่าง ๆ รวมทั้งปริมาณกรดนิวคลีอิกและเอนไซม์ของตนเพื่อให้เข้ากับสถานะมั่นคงระดับใหม่ ในทางปฏิบัติจึงควรเปลี่ยนแปลงระดับอัตราความเร็วในการเจือจางหรือสภาวะอื่น ๆ ไปทีละเล็กละน้อยหรือเป็นขั้นตอนสั้น ๆ และใช้เวลาทั้งหมดสำหรับแต่ละขั้นตอนประมาณ $3\,t_r$

เพื่อให้ถึงสถานะมั่นคงอันใหม่ที่ต้องการ

5.7 จุดประสงค์พิเศษของการหมักแบบคงที่ทางเคมี

จุดประสงค์ที่ไม่เหมือนใครสามประการของการหมักแบบคงที่ทางเคมีในการควบคุมการเจริญเติบโตและพฤติกรรมของจุลินทรีย์อาจสรุปได้ดังนี้ คือ

1. การหมักแบบคงที่ทางเคมีทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตได้โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต แต่ไม่ต้องเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม ในการหมักแบบเก็บกักอย่างง่ายอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตอาจถูกทำให้เปลี่ยนแปลงได้โดยเพียงแต่เปลี่ยนแปลงคุณภาพของสารอาหารหรือเปลี่ยนแปลงปริมาณของสภาวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับทางเคมีกายภาพ (physicochemical condition) เช่น ค่าของอุณหภูมิหรือพีเอช(pH) วิธีการทำให้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไปแบบนี้อาจมีผลต่อสิ่งอื่นซึ่งสามารถกลบเกลื่อนผลกระทบต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโต ตัวอย่างเช่นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอาจมีผลกระทบต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตและปริมาณอาร์เอนเอของแบคทีเรียโดยอิสระแก่กัน ดังแสดงในตอนที่ 13.6

2. จุดประสงค์ที่สองกลับกันกับข้อที่หนึ่งคือเพื่อทำให้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตคงที่ในขณะที่สภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป จุดประสงค์นี้มีความสำคัญต่อการจำแนกความแตกต่างระหว่างผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตและผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมโดยไม่เกี่ยวข้องกันได้

3. จุดประสงค์ที่สามเพื่อรักษาไว้ซึ่งความเข้มข้นคงที่ของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตด้วยอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตคงที่ ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตจะถูกทำให้มีอยู่ได้เพียงชั่วคราวในการหมักแบบเก็บกักแล้วถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปร่วมด้วยกับการเปลี่ยนแปลงอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต แต่การหมักแบบคงที่ทางเคมีช่วยทำให้เกิดสภาวะคงที่ของสิ่งแวดล้อมซึ่งอาจเป็นไปได้อย่างกว้างขวางยิ่งขึ้นรวมทั้งไม่เพียงแต่สามารถทำให้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตหมดไปหรือมีมากเกินไปได้

อย่างคงที่แล้ว ยังอาจทำให้สถานะปานกลางต่าง ๆ ทั้งหมดเกิดความเกินไปอย่างคงที่ได้อีกด้วย

วิธีการหมักแบบคงที่ทางเคมีเป็นสิ่งสำคัญในการทำให้ระบบเชื้อจุลินทรีย์ง่ายขึ้นและด้วยเหตุนี้จึงช่วยให้สดวกในการแสดงออกของปฏิกริยาเนื่องจุลินทรีย์ต่อสิ่งแวดล้อม และสดวกในการควบคุมขบวนการที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ ข้อได้เปรียบของการทำให้ง่ายขึ้นแบบนี้ถูกส่งเสริมให้มีความสำคัญยิ่งขึ้นเมื่อต้องการศึกษาหรือควบคุมการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมตั้งแต่สองหรือมากกว่าสองสายพันธุ์ขึ้นไปดังในบทที่ 20.