บทที่ 6
การจัดทำอย่างปราณีตต่อการหมักแบบคงที่ทางเคมี

6.1 คำนำ

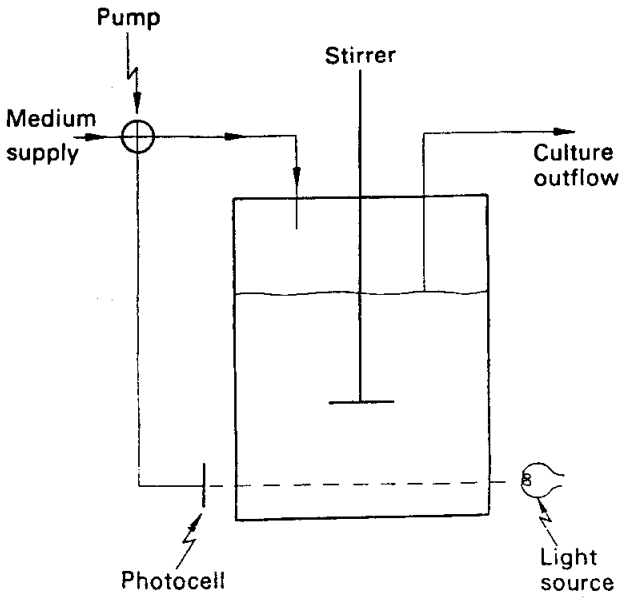
การกระทำอย่างปราณีตต่อการหมักแบบคงที่ทางเคมีช่วยเพิ่มระดับความเป็นไปได้ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเมื่อสภาวะเข้าขั้นวิกฤตหรือรุนแรงมาก เช่น เมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเข้าใกล้จุดสูงสุดหรือมีซับสเตรตที่เจือจางมาก Bryson (1952) ได้เป็นบุคคลแรกที่ประดิษฐ์เครื่องมือในการหมักแบบความขุ่นคงที่ (Turbidostat) ซึ่งก็เป็นเครื่องมือในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอย่างหนึ่งที่มีเซลล์กระแสไฟฟ้าจากแสงสว่าง (Photoelectric cell) ประกอบอยู่ด้วยเพื่อรับทราบความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์แล้วควบคุมการเติมสื่อกลางอาหารใหม่ลงไปเมื่อความหนาแน่นของชีวมวลสูงเกินกว่าระดับที่ต้องการ การวัดความขุ่นถูกใช้ได้อย่างจำกัดเฉพาะกับเชื้อจุลินทรีย์เซลล์เดียวเท่านั้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการตรวจสอบชีวมวลโดยวิธีการอื่นได้ถูกใช้เพื่อประยุกต์ให้กว้างขวางยิ่งขึ้น แต่คำว่าการควบคุมให้ความขุ่นคงที่ (terbidostatic control) ก็ยังคงใช้กันอยู่กับวิธีการตรวจสอบชีวมวลแบบอื่น การป้อนชีวมวลย้อนกลับ (Biomass Feedback) คำนี้ถูกใช้หมายถึงการทำให้ความเข้มข้นของชีวมวลสูงขึ้นโดยการเติมชีวมวลที่ออกมากลับเข้าไปใหม่อีก การหมักแบบคงที่ทางเคมีเป็นลำดับ (Chemostats in Series) เป็นการจัดทำอย่างปราณีตอีกแบบหนึ่งซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบคงที่ทางเคมีเพียงครั้งเดียว แบบใหม่ ๆ ของระบบนี้ได้ถูกปรับปรุงขึ้นโดยทางทฤษฎีอาจแบ่งออกได้เป็นหลายระบบแต่ยังไม่ได้รับการทดสอบอย่างเหมาะสมและกว้างขวาง เนื่องจากงานการทดลองในด้านนี้ได้รับอุปสรรค์จากเครื่องมือซึ่งยังไม่ละเอียดปราณีตพอ

6.2 การหมักแบบความขุ่นคงที่ (TURBIDOSTAT)

6.2.1 หลักการเกี่ยวกับการหมักแบบความขุ่นคงที่

การควบคุมความขุ่นให้คงที่ด้วยเซลล์กระแสไฟฟ้าจากแสงสว่างเพื่อรับทราบ

ความหนาแน่นของชีวมวลได้แสดงไว้ในรูปที่ 6.1 เซลล์แสงสว่าง (photocell) จะส่งสัญญาณไปควบคุมให้เครื่องสูบจ่ายสื่อกลางอาหาร เมื่อเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักมีความทึบแสงมากเกินกว่าที่กำหนดไว้ ปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ถูกรักษาไว้ให้คงที่โดยอุปกรณ์ควบคุมระดับบางอย่างในที่สุดก็จะถึงสถานะมั่นคงซึ่ง เป็นไปตามความสัมพันธ์ดังสมการที่ 5.9 คือ $\tilde{x} = Y(s_r - \tilde{s})$ โดยการควบคุมให้คงที่แบบนี้ความหนาแน่นของชีวมวลจึงถูกกำหนดโดยอัตราความเร็วในการเจือจางก็จะมีการปรับตัว เอง เพื่อให้ได้ค่าที่สถานะมั่นคงจึงแตกต่างจากการหมักแบบคงที่ทาง เคมีอย่างง่ายซึ่งอัตราความเร็วในการ เจือจางจะถูกกำหนดไว้ให้คงที่แล้วความเข้มข้นของชีวมวลจะมีการปรับตัว เอง เพื่อให้ได้ระดับที่สถานะมั่นคง



รูปที่ 6.1 Turbidostat (diagrammatic) with automatic control of culture opacity.

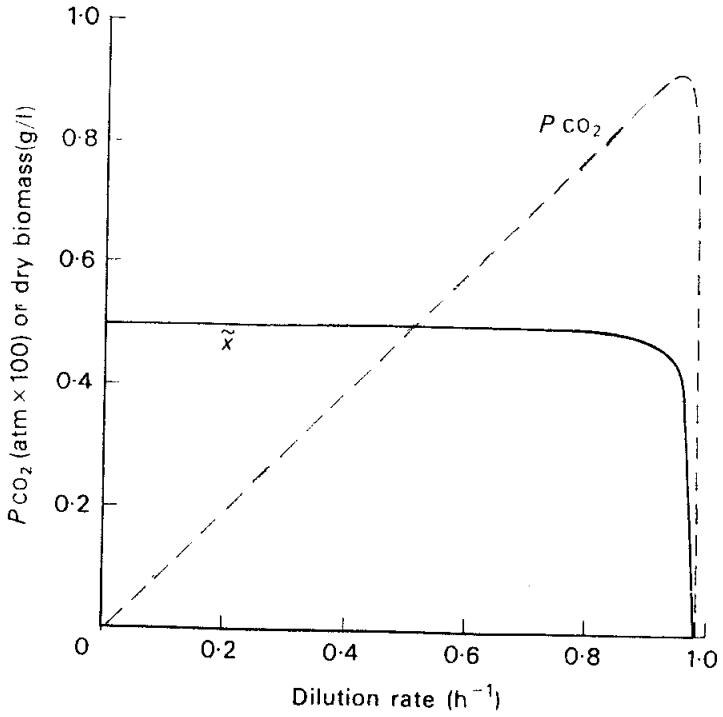
6.2.2 เครื่องมือในการควบคุมความขุ่นหรือความหนาแน่นของชีวมวลแบบอื่น

ความขุ่นจะถูกควบคุมไว้ให้คงที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยเซลล์กระแสไฟฟ้าจากแสงสว่าง เมื่อความเข้มข้นของชีวมวลเปลี่ยนแปลงไปตามการ เปลี่ยนแปลงของอัตรา

ความเร็วในการเจือจาง (D)ได้อย่างรวดเร็วซึ่งก็คือในช่วงที่ใกล้หรือเกือบจะถึงอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤต แต่ถ้าความเข้มข้นของชีวมวลเปลี่ยนแปลงไปตาม D ได้เพียงเล็กน้อยซึ่งก็คือในช่วงที่อัตราความเร็วในการเจือจางต่ำลงมาดังรูปที่ 5.4 การควบคุมความขุ่นในช่วงนี้โดยทางปฏิบัติจะไม่ว่องไวต่อการปรับอัตราความเร็วในการเจือจางให้สมดุลย์ ดังนั้นในช่วงนี้จึงมักนิยมใช้การควบคุมอย่างการหมักแบบคงที่ทางเคมีชรรมดา ในทางปฏิบัติการวัดความขุ่นถูกจำกัดให้ใช้ได้กับพวกจุลินทรีย์เซลล์เดียวเท่านั้นและยากที่จะใช้สำหรับการหมักเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานเนื่องจากอาจเกิดปัญหาเกี่ยวกับการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์ตรงพื้นผิวที่แสงส่องผ่าน

การควบคุมความขุ่นให้คงที่อาจตั้งอยู่บนพื้นฐานของสิ่งอื่นเพื่อทำให้รับทราบถึงผลผลิตที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต(**Growth-linked Product**) เช่น การเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ หรือการเกิดผลผลิตที่เป็นกรด หรือการใช้ซับสเตรตเพื่อการเจริญเติบโต **Watson** (1972) ได้ใช้วิธีการควบคุมความขุ่นให้คงที่โดยใช้อุปกรณ์ตรวจสอบคาร์บอน-ไดออกไซด์จากแกสที่ปล่อยออกมา เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ถ้าอัตราการไหลของแกสคงที่ส่วนความกัน (**partial pressure**) ของคาร์บอนไดออกไซด์ถูกกำหนดได้โดย $(P_{CO_2})=kDx$ ซึ่ง k คือค่าคงที่ เส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง P_{CO_2} กับ D สำหรับเกณฑ์มาตราฐานได้แสดงไว้ในรูปที่ 6.2 แตกต่างจากการวัดความขุ่นคือมีค่าที่สถานะมั่นคงสองค่าซึ่งอาจเป็นไปได้สำหรับค่า P_{CO_2} หนึ่งที่กำหนดให้ ถ้าเครื่องควบคุมถูกตั้งไว้ให้กระตุ้นปั๊มสื่อกลางสารอาหารทำงานเฉพาะเมื่อ P_{CO_2} สูงเกินกว่าค่าที่กำหนดไว้ก็จะได้สถานะมั่นคงคงที่ที่อัตราความเร็วในการเจือจางสูง ในทางกลับกันถ้าเครื่องควบคุมถูกตั้งไว้ให้กระตุ้นการทำงานของปั๊มสื่อกลางสารอาหารเฉพาะเมื่อความกันของคาร์บอนไดออกไซด์ตกลงต่ำกว่าค่าที่ตั้งเอาไว้จะทำให้ P_{CO_2} มีค่าต่ำกว่าขีดสูงสุดและสถานะมั่นคงคงที่จะอยู่ที่อัตราความเร็วในการเจือจางต่ำ ดังนั้นจึงแตกต่างจากการควบคุมความขุ่นเพราะการควบคุม P_{CO_2} ทำให้สามารถควบคุมได้อย่างคงที่ในทุกช่วงของอัตราความเร็วในการเจือจางหรือทุกค่าที่สถานะมั่นคง การเกิดกรดเช่นกรดแลคติกก็เช่นเดียวกันอาจถูกตรวจสอบได้ด้วยพีเอชอีเล็คโทรด(**pH electrode**) แล้วใช้เป็นสื่อในการควบคุมความขุ่นให้คงที่ได้ ทำนองเดียวกันกับความเข้มข้นของซับสเตรตบางอย่างซึ่งอาจถูกตรวจสอบได้อย่างทันทีทันใดก็สามารถนำมาใช้เป็นสื่อในการควบคุม

ความขุ่นให้คงที่ได้ การวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลาย(dissolved oxygen) ด้วยออกซิเจนอีเล็คโตรดก็เคยถูกใช้เพื่อการนี้(Hospodka, 1966) การใช้ซับสเตรตที่เป็นแกสเช่น ออกซิเจนหรือมีเทนโดยหลักการแล้วก็สามารถใช้เป็นสื่อในการควบคุมความขุ่นให้คงที่ได้ วิธีการนี้ตั้งอยู่บนพื้นฐานที่คล้ายคลึงกันกับการเกิดแกสคาร์บอนไดออกไซด์แต่ส่วนความดันของซับสเตรตที่เป็นแกสมีความหมายในทางตรงกันข้ามกับความหมายที่ใช้สำหรับคาร์บอนไดออกไซด์



รูปที่ 6.2 Carbon dioxide partial pressure (PCO_2) in effluent gas from chemostat as a function of dilution rate. Data for biomass production is the same as that given in Fig. 5.4; growth-limiting substrate concentration in feed, 1 g/l; gas flow rate 30 l (l culture h)$^{-1}$; $\tilde{x}$ = biomass concentration.

6.2.3 การควบคุมอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตจากภายในเซลล์

ได้มีข้อโต้แย้งบางประการเกี่ยวกับปัญหาว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของชีวมวลถูกควบคุมโดยขบวนการอะไรเมื่อเชื้อจุลินทรีย์ถูกรักษาไว้ให้อยู่ใกล้หรืออยู่ที่อัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤตซึ่งเป็นจุดประสงค์หนึ่งในการควบคุมความขุ่น(Herbert, 1958) เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการ

เจริญเติบโตมีค่าใกล้เคียงกันกับค่า K_s จะดูเหมือนว่าการใช้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตเป็นขบวนการที่กำหนดจำกัดอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต(Rate-limiting Process) หรือเป็นปฏิกริยานายควบคุม("Master" reaction) อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตสูงเกินกว่าค่า K_s จะปรากฏว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตกลายเป็นเสมือนเป็นอิสระจากความเข้มข้นของซับสเตรตและการใช้ซับสเตรตใดซับสเตรตหนึ่งแต่เพียงอย่างเดียวก็ไม่อาจทำหน้าที่เป็นปฏิกริยานายควบคุมได้ ดังนั้นอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตในกรณีหลังนี้จึงอาจเป็นผลสะท้อนมาจากอัตราความเร็วของหลายปฏิกริยาภายในเซลล์ พฤติกรรมเช่นนี้ถูกชี้แสดงให้เห็นได้โดยแบบจำลองอย่างง่ายของลำดับปฏิกริยาซับซ้อน(Dean & Hinshelwood, 1966, p. 125)

6.2.4 ประโยชน์จากการหมักแบบความขุ่นคงที่

การหมักแบบความขุ่นคงที่เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้ให้มีชีวิตอยู่ได้หลายชั่วอายุในสภาพแวดล้อมคงที่ด้วยซับสเตรตอย่างเหลือเฟือ เนื่องจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตอาจถูกทำให้เปลี่ยนแปลงได้ดังนั้นจึงอาจใช้ระบบนี้เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว Bryson (1952) ได้เริ่มใช้วิธีการนี้เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความทนทานต่อสารปฏิชีวนะได้อย่างอัตโนมัติ การเพิ่มขึ้นของอัตราความเร็วสูงสุดในการเจริญเติบโตอาจเป็นผลเนื่องมาจากการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันทั้งในด้านพันธุกรรมและด้านการทำให้เหมาะสมเกี่ยวกับกลไกในการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่คาดหวังกันไว้สำหรับระบบอัตโนมัติสังเคราะห์ (Autosynthetic system) ดังจะได้กล่าวถึงต่อไปในบทที่ 24 การควบคุมความขุ่นให้คงที่ยังทำให้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีมีความทนทานต่อสารยับยั้งเช่นฟีนอลมากขึ้น (ตอนที่ 17.8) แม้แต่ในขบวนการสองขั้นตอน (Two-stage process) ก็ยังอาจถูกใช้เพื่อจุดประสงค์นี้ (ตอนที่ 6.4.3)

6.3 การหมักแบบคงที่ทางเคมีพร้อมด้วยการเติมชีวมวลย้อนกลับ

6.3.1 หลักการโดยทั่วไป

การหมักแบบคงที่ทางเคมีพร้อมด้วยการติดตั้งอุปกรณ์บางอย่างช่วยให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของชีวมวลให้สูงมากขึ้นเกินกว่าค่าซึ่งเป็นไปได้สำหรับการหมักแบบคงที่ทางเคมีอย่างธรรมดา นั่นก็คือ $Y(s_r - s)$ เป็นขอบเขตของการหมักแบบคงที่ทางเคมีที่มีการย้อนกลับของชีวมวล(Pirt & Kurowski,1970) ความเข้มข้นที่สูงขึ้นอาจถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยวิธีการต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 6.3 ในระบบ(a) ของเหลวหรือสื่อกลางที่ปราศจากเซลล์หรือมีชีวมวลเจือจางจะถูกดูดออกมาโดยการกรองแล้วยังมีท่อสำหรับปล่อยชีวมวลเข้มข้นออกมาด้วย ในระบบ(b)เชื้อจุลินทรีย์ถูกแบ่งออกเป็นสองตอน ตอนล่างเป็นตอนที่มีการปั่นกวนหรือคนจนเป็นเนื้อเดียวกันและมีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่วนตอนบนเหนือใบพัดกวนเป็นตอนซึ่งมีการตกตะกอนเสมือนไม่มีการเจริญเติบโต ชีวมวลสามารถตกตะกอนกลับเข้าสู่ตอนที่ถูกกวนหรือคนได้ ของเหลวหรือสื่อกลางที่ปราศจากเซลล์หรือมีชีวมวลเจือจางจะถูกปล่อยออกไปทางตอนบนของถังหมักและชีวมวลเข้มข้นในของเหลวหรือสื่อกลางสามารถถูกปล่อยออกไปได้จากตอนที่มีการเจริญเติบโต ในระบบกระแสทางเดียว ("Monostream" system)(c) ถือว่าชีวมวลถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการกรองหรือตกตะกอนก่อนถึงท่อทางออกแต่ไม่มีท่อทางออกสำหรับชีวมวลเข้มข้น ในระบบ(d)ชีวมวลถูกทำให้เข้มข้นนอกถังหมักแล้วเชื้อจุลินทรีย์ถูกแยกออกเป็นสองกระแสของชีวมวลคือกระแสหนึ่งเจือจางและอีกกระแสหนึ่งเข้มข้น ส่วนหนึ่งของกระแสเข้มข้นจะถูกเติมกลับเข้าไปในถังหมัก ระบบ(a),(b) และ(c) เป็นแบบอย่างของการย้อนกลับภายใน (Internal Feedback) ส่วนระบบ(d) เป็นแบบอย่างของการย้อนกลับภายนอก (External Feedback)

6.3.2 การย้อนกลับภายใน(INTERNAL FEEDBACK)

เมื่อพิจารณาถึงวิธีการกรองดังแสดงในรูปที่ 6.3(a) ความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตตรงจุดต่าง ๆ ในระบบได้แสดงไว้ในรูป ค่าเศษส่วนของสิ่งที่ไหลออกมาแต่ไม่ได้ถูกกรองคือ c ดังนั้นอัตราส่วนการไหลออกของกระแสชีวมวลที่ถูกกรองหรือเจือจางคือ $(1-c)F$ ความเข้มข้นของชีวมวลใน

กระแสที่เจือจางคือ hx อัตราความเร็วในการเจือจางทั้งหมดถูกกำหนดโดย $F/V=D$ ซึ่ง V คือปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังหมัก ความสมดุลย์สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ในที่นี้คือ

net rate of increase = growth rate − rate of output in concentrated stream − rate of output in dilute stream

ดังนั้นสำหรับหนึ่งหน่วยปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์คือ

$$dx/dt = \mu x - cDx - (1-c)Dhx \qquad 6.1$$

นั่นก็คือ

$$dx/dt = [\mu - D\{c(1-h)+h\}]x \qquad 6.2$$

เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงคือ เมื่อ $dx/dt=0$ จะได้ว่า

$$\mu = AD \qquad 6.3$$

ซึ่ง $A=c(1-h)+h$ ถ้าของเหลวที่ถูกกรองออกมานั้นปราศจากเซลล์จะได้ว่า $h=0$ และ $A=c$ อีกกรณีหนึ่งเมื่อการกรองนั้นกำจัดชีวมวลได้เพียงเล็กน้อยมากคือ $h\to 1$ ก็อาจเขียนได้ว่า $A=h$ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าขอบเขตของ A คือ c ถึง h ถ้า $h=1$ หมายความว่าไม่มีการย้อนกลับของชีวมวล ในการย้อนกลับอาจกล่าวได้ว่า $\mu<D$

เนื่องจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะถูกกำหนดโดย $\mu=\mu_m s/(s+K_s)$ ในสถานะมั่นคงเมื่อแทนค่าสำหรับ μ จะได้ว่า

$$AD = \mu_m \bar{s}/(\bar{s}+K_s) \qquad 6.4$$

ดังนั้น

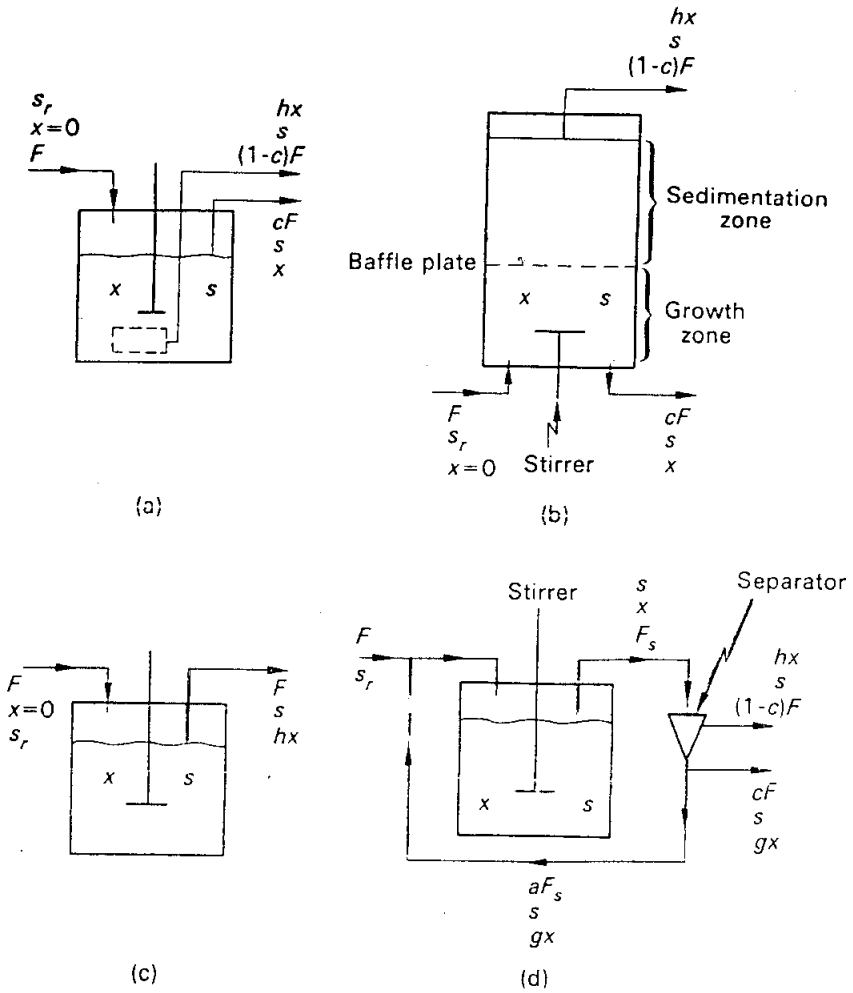
$$\bar{s} = AK_sD/(\mu_m - AD) \qquad 6.5$$

ความสมดุลย์สำหรับซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตก็ทำนองเดียวกันกับการหมักแบบคงที่ทางเคมีอย่างง่าย (สมการที่ 5.4) ดังนั้นเมื่ออยู่สถานะมั่นคงคือ เมื่อ $\mu=AD$ จะได้ว่า

$$\bar{x} = (s_r - \bar{s})Y/A \qquad 6.6$$

จากสมการที่ 6.6 จะเห็นได้ว่าการย้อนกลับเพิ่มความเข้มข้นของชีวมวลด้วย

เศษส่วน $1/A$ จึงเรียกเศษส่วนนี้ว่า "ปัจจัยความเข้มข้น" ("Concentration" factor) ที่อัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤต (D_c), $s=s_r$ และเมื่อ $s_r \gg K_s$ สมการที่ 6.4 แสดงว่าโดยความเกี่ยวเนื่องกับการหมักแบบคงที่ทางเคมีอย่างง่ายอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤตถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้ด้วยค่า μ_m/A

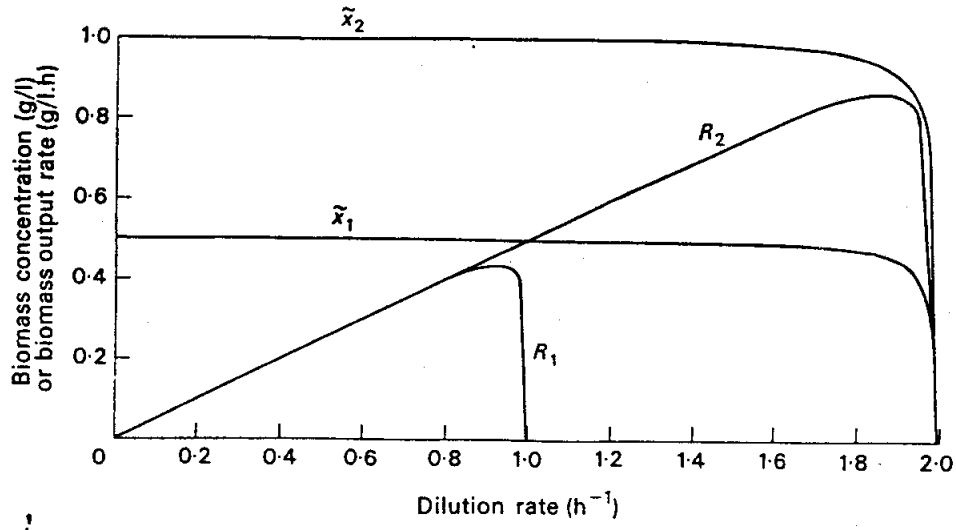


รูปที่ 6.3 Various systems for feedback of biomass in a chemostat: (a) internal filtration; (b) internal sedimentation; (c) monostream feedback; (d) external feedback. *Symbols:* F, F_s, flow rates; x, biomass concentration; s, s_r growth-limiting substrate concentrations; c, g, h, are constants (dimensionless).

อัตราการออกไปของชีวมวลต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของ เชื้อจุลินทรีย์ที่สถานะมั่นคงถูกกำหนดได้โดย

$$R = \{(1-c)h+c\}D\tilde{x} = AD\tilde{x} \qquad 6.7$$

ผลของชีวมวลย้อนกลับต่อความเข้มข้นของชีวมวลและอัตราการออกไปถูกแสดงได้ดังในรูปที่ 6.4 ผลลัพธ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งก็คือการย้อนกลับช่วยเพิ่มอัตราการออกไปสูงสุดของชีวมวล ชีวมวลย้อนกลับโดยการกรองในการหมักแบบคงที่ทางเคมีได้ถูกทำให้เป็นจริงขึ้นจากการทดลองโดย Pirt & Kurowski (1970)



รูปที่ 6.4 Comparison of biomass concentrations and output rates in steady states of chemostat cultures with and without feedback. *Symbols:* $\tilde{x}_1$ = biomass concentration in chemostat without feedback; $\tilde{x}_2$ = biomass concentration in chemostat culture with feedback; R_1 = biomass output rate per unit volume without feedback, R_2 = biomass output rate of chemostat with feedback; $\mu_m = 1{\cdot}00\ h^{-1}$; $s_r = 1{\cdot}0$ g/l; $K_s = 0{\cdot}005$ g/l; 'concentration factor' (A or B) = 2·0.

ชีวมวลย้อนกลับอาจถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยการตกตะกอนดังแสดงในรูปที่ 6.3(b) ถ้าถือว่าการเจริญเติบโตเกิดขึ้นได้เฉพาะที่ตอนล่างของ เชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นเนื้อเดียวกันโดยถูกกวนด้วยใบพัดและชีวมวลที่ตกตะกอนลงมาจากตอนบนสามารถเจริญ–เติบโตได้ทันทีเมื่อกลับเข้าสู่ตอนล่างซึ่งมีการเจริญเติบโต ดังนั้นการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เช่นนี้จึงควรเป็นไปตามแบบจำลองสำหรับการย้อนกลับภายในดังกล่าวข้างต้น

ในระบบกระแสทางเดียวของการย้อนกลับภายในดังรูปที่ 6.3(c) มีทางออก

สำหรับกระแสชีวมวลเจือจางเท่านั้น ระบบนี้ต้องการการตกตะกอนหรือการกรองของชีวมวลในกระแสทางออก สำหรับระบบนี้จะกำหนดให้ V= ปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ในตอนล่างซึ่งมีการเจริญเติบโต ถ้าสถานะมั่นคงถูกทำให้เกิดขึ้นได้ระบบนี้ก็ถูกทดแทนได้ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการย้อนกลับภายในโดย $c=0$ และ $A=h$ สำหรับหอหมัก (Tower Fermenter) ซึ่งถูกเสนอโดย Royston (1966) ก็ถูกจัดว่าเป็นระบบนี้เช่นเดียวกันแต่ในทางปฏิบัติดูเหมือนว่าไม่อาจเป็นไปได้ในการควบคุมปัจจัยความเข้มข้นและการกระทำให้เกิดสถานะมั่นคง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้ระบบกระแสคู่ควบซึ่งมีทางออกสำหรับชีวมวลเข้มข้นและเจือจางที่สามารถควบคุมปัจจัยความเข้มข้นได้ การย้อนกลับภายในอาจเกิดขึ้นได้อย่างไม่ตั้งใจในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอย่างง่ายถ้าท่อทางออกยอมให้ชีวมวลบางส่วนตกตะกอนกลับเข้าไปอยู่ในถังหมักได้อีกหรือเกิดกรณีผิดพลาดในท่อทางออกทำให้มีการกรองชีวมวล

6.3.3 การย้อนกลับจากภายนอก (EXTERNAL FEEDBACK)

การหมักแบบคงที่ทางเคมีพร้อมด้วยการย้อนกลับของชีวมวลจากภายนอกและตัวแปรเสริมต่าง ๆ ทางคณิตศาสตร์ได้แสดงไว้ในรูปที่ 6.3(d) เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกดูดออกมาจะผ่านเข้าไปในเครื่องแยกเช่นเครื่องเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) ทำให้ชีวมวลเข้มข้นขึ้นและทำให้ได้ทั้งกระแสชีวมวลเข้มข้นและเจือจาง ส่วนหนึ่งของกระแสเข้มข้นจะถูกเติมกลับเข้าไปในถังหมัก อัตราความเร็วในการเจือจางทั้งหมดจะได้ว่า $F/V=D$ ซึ่ง V คือปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในถังหมัก อัตราความเร็วในการไหลออกของเชื้อจุลินทรีย์จากถังหมักจะได้ว่า

$$F_s = F+aF_s \qquad 6.8$$

ซึ่ง a ก็คือค่าเศษส่วนของกระแสของเหลวไหลออกที่ถูกเติมกลับเข้าไป จากสมการที่ 6.8 จะได้ว่า $F_s= F/(1-a)$ เครื่องแยกช่วยทำให้ชีวมวลเข้มข้นขึ้นโดยมีค่าเป็นตัวแปรเท่ากับ g ดังนั้นปริมาณของชีวมวลที่ถูกเติมกลับเข้าไปก็คือ agF_s จะเห็นได้ว่า ag คือค่าเศษส่วนของชีวมวลที่ออกจากถังหมักแล้วถูกเติมกลับเข้าไป

ความสมดุลย์ของชีวมวลสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ถูกกำหนดได้ว่า

$$\text{net growth} = \text{growth} - \text{output} + \text{feedback}$$

ดังนั้นสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดจึง เป็น

$$V.dx = V\mu x.dt - F_s x.dt + aF_s gx.dt \qquad 6.9$$

แทนค่าสำหรับ F_s และหารตลอดด้วย $V.dt$ ในสมการที่ 6.9 จะได้ว่า

$$dx/dt = \mu x - Dx/(1-a) + agDx/(1-a) \qquad 6.10$$

และเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงคือเมื่อ $dx/dt = 0$ จะได้ว่า

$$(\mu - BD)\tilde{x} = 0 \qquad 6.11$$

ซึ่ง $B = (1-ag)/(1-a)$ ค่าตัวประกอบ B เป็นเศษส่วนทางบวกเนื่องจาก $1 > ag > a$ ถ้า $ag = 1$ หมายความว่าชีวมวลทั้งหมดถูกทำให้ย้อนกลับหรือเติมกลับแต่ไม่สามารถทำให้อยู่ในสถานะมั่นคงได้ ถ้าอยู่ในสถานะมั่นคงค่า $\mu = BD$ ดังนั้น $\mu < D$ แทนค่า $\mu = \mu_m s/(s+K_s)$ จะได้ว่า

$$\tilde{s} = BDK_s/(\mu_m - BD) \qquad 6.12$$

สำหรับความสมดุลย์ของซับสเตรทที่กำหนดจำกัดการ เจริญเติบโตจะได้ว่า

$$\begin{matrix}\text{net rate of} \\ \text{increase}\end{matrix} = \begin{matrix}\text{input} \\ \text{rate}\end{matrix} + \begin{matrix}\text{feedback} \\ \text{rate}\end{matrix} - \begin{matrix}\text{output} \\ \text{rate}\end{matrix} - \begin{matrix}\text{substrate utilized} \\ \text{for growth}\end{matrix}$$

ดังนั้นสำหรับหนึ่งหน่วยปริมาตรของ เชื้อจุลินทรีย์จะได้ว่า

$$ds/dt = Ds_r + aDs/(1-a) - Ds/(1-a) - \mu x/Y \qquad 6.13$$

เมื่อทอน เป็นสมการสำหรับ ds/dt ในการหมักแบบคงที่ทาง เคมีอย่างง่าย (สมการที่ 5.4) แทนค่า $\mu = BD$ ในสมการที่ 5.4 จะได้ค่าสำหรับ x เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคง คือ

$$\tilde{x} = (s_r - \tilde{s})Y/B \qquad 6.14$$

ในที่นี้ $1/B$ คือปัจจัยความเข้มข้น อัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤต (D_c) จะเกิดขึ้นได้เมื่อ $\tilde{s} = s_r$ และถ้า $s_r \gg K_s$ จะได้ว่า $D_c \approx \mu_m/B$

ความเข้มข้นของชีวมวล (hx) ในกระแสชีวมวลเจือจางที่ออกมาอาจคำนวนได้จากความสมดุลย์ของชีวมวล คือ

$$F_s\tilde{x} = aF_s g\tilde{x} + cFg\tilde{x} + (1-c)Fh\tilde{x} \qquad 6.15$$

แทนค่าสำหรับ F_s จะได้ว่า

$$h = (B-cg)/(1-c) \qquad 6.16$$

อัตราความเร็วในการออกไปของชีวมวลต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของระบบจะได้ว่า

$$R = F_s\tilde{x}/V - aF_sg\tilde{x}/V \qquad 6.17$$

และแทนค่าสำหรับ F_s จะได้ว่า

$$R = BD\tilde{x} \qquad 6.18$$

6.3.4 ประโยชน์จากการเติมชีวมวลย้อนกลับ

โดยการย้อนกลับของชีวมวลดังกล่าวข้างต้นอัตราความเร็วสูงสุดในการออกไปของชีวมวลและผลผลิตต่าง ๆ ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีสามารถถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้ การเพิ่มขึ้นจะเป็น α เท่า ซึ่งค่า α คือปัจจัยความเข้มข้น ข้อดีเช่นนี้มีประโยชน์เมื่อซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตจำเป็นต้องถูกทำให้เจือจางมากอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ตัวอย่างเช่นในการหมักเหล้าหรือเบียร์หรือการทำให้สิ่งที่ไหลออกมาบริสุทธิ์ขึ้นหรือเมื่อซับสเตรตมีการละลายต่ำ ในการหมักเบียร์และการทำให้น้ำโสโครกบริสุทธิ์อาจทำให้มีปัจจัยความเข้มข้นสูงได้ถึง 100 ระบบนี้ยังมีข้อดีอีกเมื่อความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตจำเป็นต้องถูกจำกัด เนื่องจากการเกิดผลผลิตยับยั้ง นอกจากนี้การเติมชีวมวลย้อนกลับยังช่วยป้องกันการเกิดวิกฤตการณ์ที่เรียกว่าการสตุดบรรจุ(shock loading) ด้วยซับสเตรตที่ยับยั้งเนื่องจากอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤตถูกทำให้สูงขึ้น

6.4 การหมักแบบคงที่ทางเคมีที่ต่อกันเป็นลำดับ (CHEMOSTATS IN SERIES)

6.4.1 ระบบหลายกระแส (MULTI-STREAM TYPE)

การหมักแบบคงที่ทางเคมีอาจถูกเชื่อมต่อเข้าด้วยกันเป็นลำดับดังรูปที่ 6.5 ทำให้ได้ขบวนการหลายขั้นตอน (multi-stage process)ซึ่งมีสภาวะแตกต่างกันในแต่ละขั้นตอน เมื่อพิจารณาถึงระบบสองขั้นตอน(two-stage system) ดังรูปที่ 6.5 ซึ่งถูกเรียกว่าแบบหลายกระแสเนื่องจากมีการเติมสื่อกลางอาหารลงไปทั้งในการหมัก

ขั้นตอนแรกและขั้นตอนที่สอง ถ้าให้ F_{01} = อัตราการไหลของสื่อกลางอาหารลงไปในการหมักขั้นตอนที่หนึ่ง F_{12} = อัตราการไหลของเชื้อจุลินทรีย์จากการหมักในขั้นตอนที่หนึ่งเข้าไปในขั้นตอนที่สอง F_{02} = อัตราไหลของสื่อกลางอาหารลงไปในการหมักขั้นตอนที่สอง ปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นตอนที่หนึ่งและที่สองคือ V_1 และ V_2 ตามลำดับ อัตราความเร็วในการเจือจางทั้งหมดในขั้นตอนที่สองถูกกำหนดได้เป็น

$$D_2 = (F_{02}+F_{12})/V_2 = F_{02}/V_2+F_{12}/V_2 = D_{02}+D_{12} \qquad 6.19$$

D_{02} และ D_{12} หมายถึงส่วนของอัตราความเร็วในการเจือจาง (partial dilution rate) ความสมดุลย์ของชีวมวลในขั้นตอนที่สองถูกกำหนดได้เป็น

net rate of increase = growth rate + input rate − output rate

ความสมดุลย์สำหรับหนึ่งหน่วยปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ (dt)คือ

$$dx_2/dt = \mu_2 x_2 + D_{12}x_1 - D_2 x_2 \qquad 6.20$$

x_1 และ x_2 คือความเข้มข้นของชีวมวลในขั้นตอนที่หนึ่งและที่สองตามลำดับ เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงคือเมื่อ $dx_2/dt=0$ สมการที่ 6.20 จะกลายเป็น

$$(\mu_2 - D_2)\tilde{x}_2 + D_{12}\tilde{x}_1 = 0 \qquad 6.21$$

ดังนั้น

$$\mu_2 = D_2 - D_{12}\tilde{x}_1/\tilde{x}_2 \qquad 6.22$$

จากสมการที่ 6.22 จะเห็นได้ว่า $\mu_2 < D_2$ เมื่อจัดเรียงสมการที่ 6.22 เสียใหม่จะได้ว่า

$$\tilde{x}_2 = D_{12}\tilde{x}_1/(D_2-\mu_2) \qquad 6.23$$

จากสมการที่ 6.23 จะเห็นได้ว่าตราบใดที่ยังมี $\tilde{x}_1$ ก็จะมี $\tilde{x}_2$ ด้วยเสมอไม่ว่า D_2 จะมีค่ามากเท่าไรก็ตาม จึงหมายความว่าไม่มีอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤตสำหรับขั้นตอนที่สอง

ความสมดุลย์ของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในขั้นตอนที่สองคือ

rate of increase = rate of input from first stage + rate of input of fresh medium − outflow rate − consumption rate

ดังนั้นสำหรับหนึ่งหน่วยปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็น

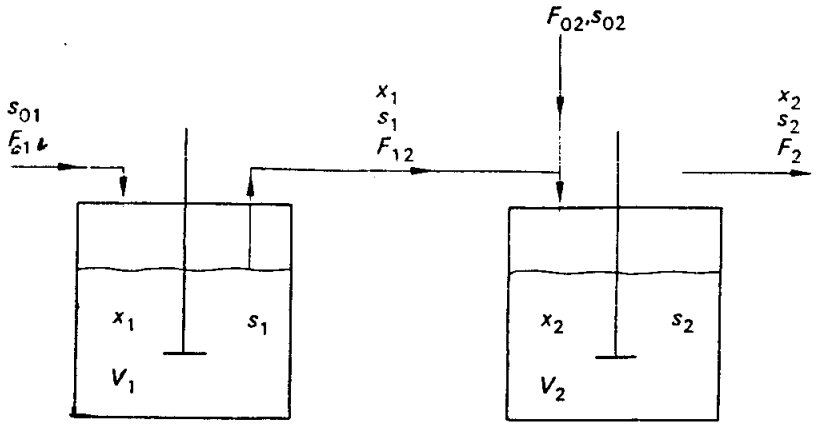
$$ds_2/dt = D_{12}s_1 + D_{02}s_{02} - D_2 s_2 - \mu_2\tilde{x}_2/Y \qquad 6.24$$

เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงสมการที่ 6.24 จะเป็น

$$D_{12}\tilde{s}_1 + D_{02}s_{02} - D_2\tilde{s}_2 - \mu_2\tilde{x}_2/Y = 0 \qquad 6.25$$

เมื่อแทนค่าสำหรับ μ_2 ในสมการที่ 6.25 โดยสมการที่ 6.22 แล้วใส่ค่า $\tilde{x}_1 = Y(s_{01} - \tilde{s}_1)$ จะได้ว่า

$$\tilde{x}_2 = Y\left(\frac{D_{12}}{D_2}s_{01} + \frac{D_{02}}{D_2}s_{02} - \tilde{s}_2\right) \qquad 6.26$$



รูปที่ 6.5 Two chemostats in a series of 'multi-stream' type. The symbols F, V, x and s represent respectively the flow rates, culture volumes, biomass and growth-limiting substrate concentrations at the various points. In the 'single-stream' type the flow of medium (F_{02}) into the second stage would be zero.

เพื่อใช้ในการคำนวนหาค่า $\tilde{s}_2$ จึงแทนค่า $\mu_2 = \mu_m s_2/(s_2 + K_s)$ ในสมการที่ 6.25 จากสมการที่ 6.25 และ 6.26 จะได้ว่า

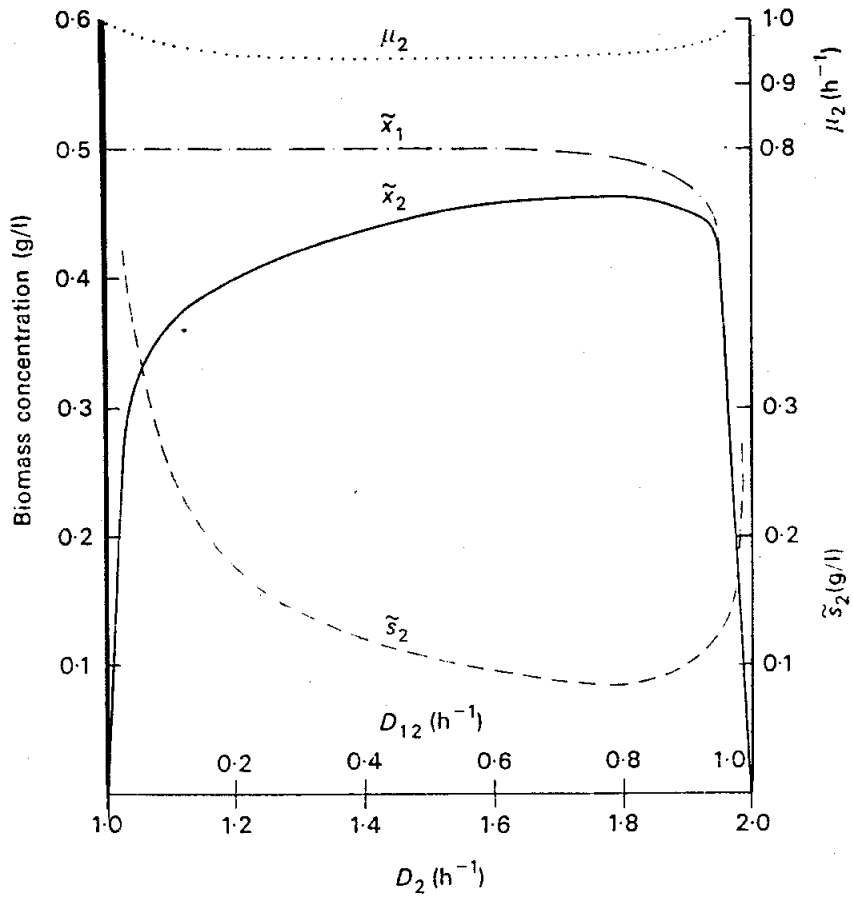
$$(\mu_m - D_2)\tilde{s}_2^2 - \left\{\frac{\mu_m D_{12}s_{01}}{D_2} + \frac{(\mu_m - D_2)D_{02}s_{02}}{D_2} - D_{12}\tilde{s}_1 + K_sD_2\right\}\tilde{s}_2 + K_s(D_{12}\tilde{s}_1 + D_{02}s_{02}) = 0 \qquad 6.27$$

ผลลัพธ์ที่ได้ก็คือ

$$\tilde{s}_2 = \{-b - (b^2 - 4ac)^{1/2}\}/2a \qquad 6.28$$

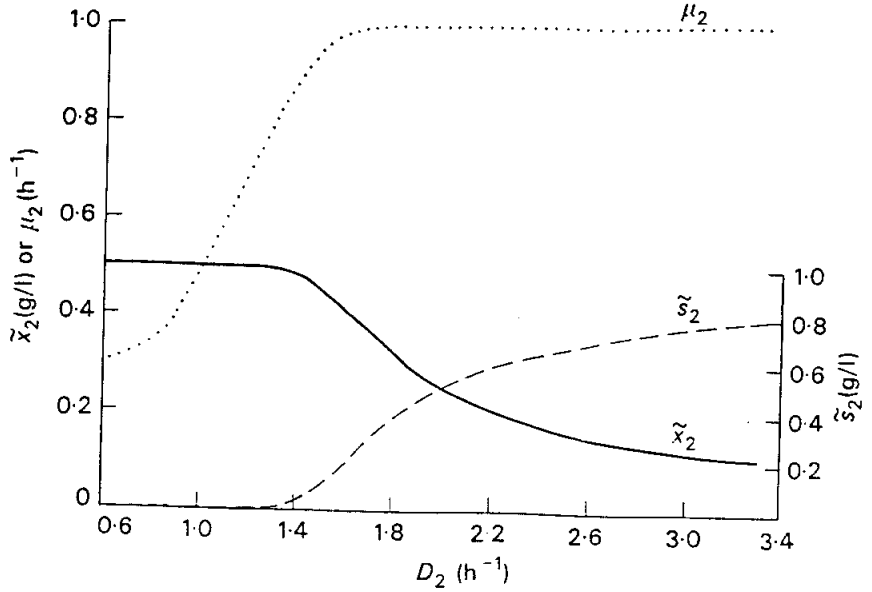
ซึ่ง $a = (\mu_m - D_2)$; $-b = \mu_m D_{12}s_{01}/D_2 + (\mu_m - D_2)D_{02}s_{02}/D_2 - D_{12}\tilde{s}_1 + K_sD_2$ และ $c = K_s(D_{12}\tilde{s}_1 + D_{02}s_{02})$ ส่วนอีกราก (root) หนึ่งของสมการนี้มีค่าเป็นลบและไม่มีความสำคัญในเชิงปฏิบัติ

ค่าตัวเลขในรูปที่ 6.6 แสดงถึงผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเชื้อจุลินทรีย์จากขั้นตอนที่หนึ่งไปยังขั้นตอนที่สอง(D_{12}) เมื่ออัตราการเติมสื่อกลางอาหารใหม่ลงไปในขั้นตอนที่สอง (D_{02}) นั้นคงที่จะเห็นได้ว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะสำหรับขั้นตอนที่สองถูกรักษาไว้เกือบถึงจุดสูงสุดคือไม่น้อยกว่า 0.94 ของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะสูงสุด ($<0{\cdot}94\,\mu_m$) ที่ทุก ๆ อัตราความเร็วในการเจือจาง นอกจากนี้สำหรับช่วงของอัตราความเร็วในการเจือจางส่วนใหญ่ก็ทำให้มีความเข้มข้นของชีวมวลค่อนข้างคงที่ทั้ง ๆ ที่มีอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูง



รูปที่ 6.6 Steady-state values of the specific growth rate (μ_2) and concentrations of biomass ($\tilde{x}_2$) and growth-limiting substrate ($\tilde{s}_2$) in the second stage of a series of two chemostats when the dilution rate in the first stage (D_1) is varied: $\tilde{x}_1$ = concentration of biomass in first stage; $\mu_m = 1{\cdot}0\ h^{-1}$; $K_s = 0{\cdot}005$ g/l; $s_{01} = s_{02} = 1{\cdot}0$ g/l; $Y = 0{\cdot}5$; $D_{02} = 1{\cdot}0\ h^{-1}$; D_{12} is varied from 0 to $1{\cdot}0\ h^{-1}$; D_2 = overall dilution rate in second stage.

เมื่ออัตราการไหลของเชื้อจุลินทรีย์จากขั้นตอนที่หนึ่งไปยังขั้นตอนที่สอง (D_{12}) ถูกทำให้คงที่แต่อัตราความเร็วในการเติมสื่อกลางสารอาหารใหม่ลงไป (D_{02}) ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปได้จะเกิดผลดังแสดงในรูปที่ 6.7 ในขั้นตอนที่สองความเข้มข้นของชีวมวลจะถูกทำให้ลดลงเป็นลำดับเมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตถูกทำให้คู่เสมือนว่าอยู่ที่จุดสูงสุดจึงแตกต่างจากการหมักแบบคงที่ทางเคมีอย่างง่าย (รูปที่ 5.4)



รูปที่ 6.7 Steady-state values of specific growth rate (μ_2) and concentrations of biomass ($\tilde{x}_2$) and growth-limiting substrate ($\tilde{s}_2$) in second stage of a series of two chemostats when the rate of flow from the first stage (D_{12}) is fixed and the rate of addition of fresh medium (D_{02}) is varied: $D_{12} = 0{\cdot}5\ h^{-1}$; values of other parameters are given in Fig. 6.6.

ในการปฏิบัติดังกล่าวข้างต้นถือว่าไม่ระยะล่าหลังในการเจริญเติบโต(lag) ของจุลินทรีย์เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตเมื่อผ่านจากขั้นตอนที่หนึ่งไปยังขั้นตอนที่สอง อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าเมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเขยิบสูงมากขึ้นก็อาจมีระยะล่าหลังเกิดขึ้นได้ก่อนที่จะมีอัตราความเร็วใหม่ในการเจริญเติบโต (ตอนที่ 5.6) นอกจากนี้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตที่ตกต่ำลงมาดูเหมือนว่าไม่ได้มีผลในการทำให้เกิดระยะล่าหลังเพื่อปรับเข้าสู่อัตราความเร็วใหม่ในการเจริญเติบโตถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงอย่างขึ้นลงตลอดเวลาของปริมาณอาร์เอนเอ(RNA) และส่วนประกอบอื่น ๆ ในชีวมวลอาจ

ยืนยาวออกไป

6.4.2 ระบบกระแสเดียวโดยไม่มีการย้อนกลับของชีวมวล

ในระบบกระแสเดียวสื่อกลางอาหารจะถูกเติมลงไปเฉพาะในขั้นตอนแรกของลำดับการหมักแบบคงที่ทางเคมี ดังนั้นสำหรับระบบสองขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 6.5 $D_{02}=0$ และ $D_{12}=D_2$ สมการที่ 6.26 จึงกลายเป็น

$$\tilde{x}_2 = Y(s_{01}-\tilde{s}_2) \qquad 6.29$$

และอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะจากสมการที่ 6.22 จะได้ว่า

$$\mu_2 = D_2(\tilde{x}_2-\tilde{x}_1)/\tilde{x}_1 \qquad 6.30$$

สำหรับระบบส่วนใหญ่ $\tilde{x}_2$ มักจะไม่แตกต่างจาก $\tilde{x}_1$ มากนักและ $\mu_2 \approx 0$ จนกว่าอัตราความเร็วในการเจือจางในขั้นตอนแรกจะใกล้เคียงกันกับค่าวิกฤตหรือมีสิ่งยับยั้งปรากฏอยู่

6.4.3 ประโยชน์จากการหมักแบบคงที่ทางเคมีที่ต่อกันเป็นลำดับ

การออกแบบเครื่องมือเพื่อการทดสอบสำหรับการหมักแบบคงที่ทางเคมีสองขั้นตอนได้ถูกบรรยายโดย Callow & Pirt (1961) ด้วยระบบกระแสเดียวซึ่งการเจริญเติบโตถูกจำกัดโดยซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตแต่เพียงชนิดเดียวที่ใส่ลงไป ดูเหมือนว่าการเกิดชีวมวลไม่มีข้อได้เปรียบใด ๆ จากการหมักแบบคงที่ทางเคมีที่ต่อกันเป็นลำดับ ตลอดช่วงของอัตราความเร็วในการเจือจางส่วนใหญ่ซึ่งอาจเป็นไปได้ในขั้นตอนที่หนึ่งซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตโดยแท้จริงแล้วจะถูกใช้หมดไปแล้วทำให้เชื้อจุลินทรีย์อยู่ในระยะคงที่โดยขาดอาหาร(stationary phase) ในขั้นตอนที่สอง

สำหรับการหมักในสื่อกลางสารอาหารซับซ้อนซึ่งมีแหล่งของธาตุคาร์บอนหรือไนโตรเจนมากกว่าหนึ่งอย่างก็อาจจำเป็นต้องใช้ขบวนการหมักหลายขั้นตอนแบบกระแสเดียวเพื่อทำให้ซับสเตรตทุกอย่างได้ถูกใช้ไป ตัวอย่างเช่น Harte & Webb (1967) พบว่า **Klebsiella aerogenes** ที่เพาะเลี้ยงไว้ด้วยการหมักแบบคงที่ทางเคมีในส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสและมอลโตสที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงมีเพียงน้ำตาลกลูโคสแต่

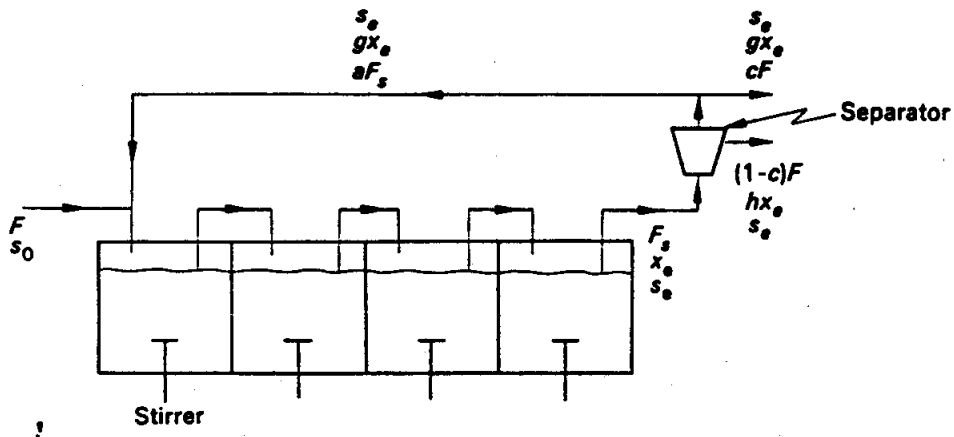
อย่างเดียวเท่านั้นที่ถูกใช้ไป ส่วนการใช้น้ำตาลมอลโตสยังคงถูกสกดอยู่แต่ในถังหมักที่ต่อเป็นลำดับที่สอง น้ำตาลมอลโตสจะถูกใช้ไปได้อย่างสมบูรณ์ โดยทั่วไประบบหลายขั้นตอนมักทำให้มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันเป็นลำดับ

ระบบหลายกระแสเป็นขบวนการที่มีประโยชน์มากสำหรับทำให้การเจริญเติบโตอยู่ในสถานะมั่นคงถ้าสถานะมั่นคงในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอย่างง่ายนั้นไม่แน่นอน ตัวอย่างเช่นอาจเกิดขึ้นได้เมื่อซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตได้ด้วย (ตอนที่ 17.8) การศึกษาของ Jones และคณะในปี 1973 เป็นตัวอย่างที่ดีในการใช้ขบวนการหมักสองขั้นตอนเพื่อตรวจสอบอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากฟีนอลซึ่งเป็นทั้งซับสเตรตยับยั้งและกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต การผลิตสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) โดยการหมักแบบคงที่ทางเคมีในขั้นตอนที่สองอาจถูกใช้เพื่อทำให้เกิดสถานะที่ไม่มีการเจริญเติบโตจึงมีการผลิตสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิเกิดขึ้น (ตอนที่ 16.5.4)

ระบบสองขั้นตอนช่วยขยายขอบเขตการใช้ประโยชน์จากการหมักแบบคงที่ทางเคมีในแง่ซึ่งว่าขั้นตอนที่สองอาจถูกใช้เพื่อทำให้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่ำลงมาจนถึงศูนย์หรือเพื่อให้ได้รับสภาวะต่าง ๆ ซึ่งคงที่จากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุด สภาวะทั้งสองอย่างนี้ไม่อาจทำให้เกิดขึ้นได้จากการหมักแบบคงที่ทางเคมีอย่างง่าย

6.5 การหมักแบบคงที่ทางเคมีที่ต่อกันเป็นลำดับพร้อมด้วยการย้อนกลับของชีวมวล

ลำดับของการหมักแบบคงที่ทางเคมีพร้อมด้วยการย้อนกลับของชีวมวลได้แสดงไว้ในรูปที่ 6.8 ระบบนี้ถูกจัดทำขึ้นโดยการแยกเอาชีวมวลออกมาแล้วทำให้เข้มข้นขึ้นเพื่อใส่กลับเข้าไปในขั้นตอนที่หนึ่งใหม่อีก ระบบนี้เป็นที่น่าสนใจคือเมื่อมีจำนวนขั้นตอนมากขึ้นก็จะคล้ายกันกับการหมักแบบปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์ไหลผ่าน



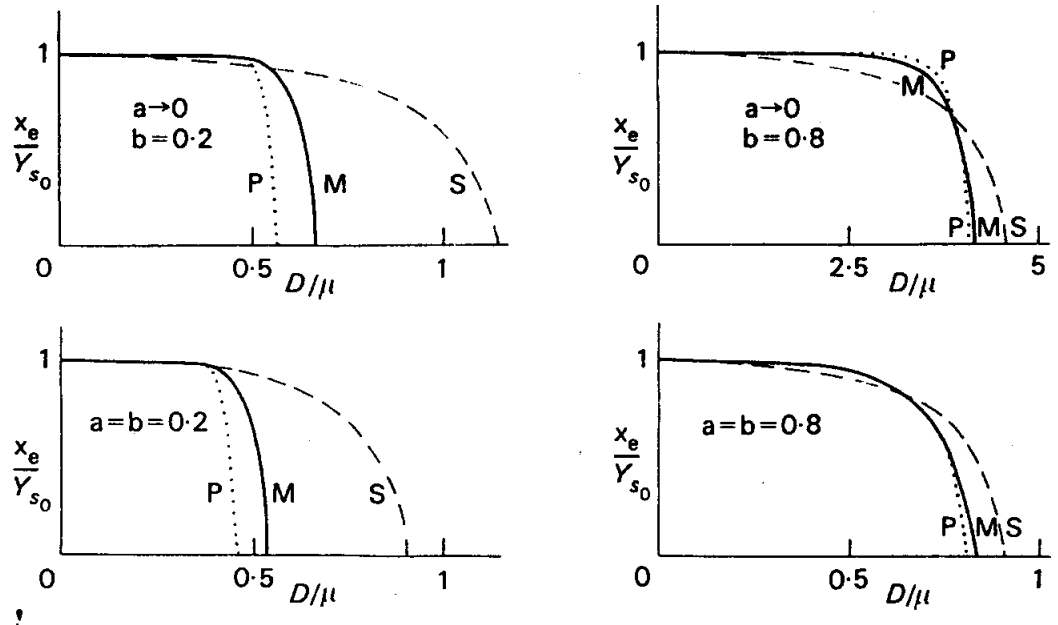
รูปที่ 6.8 Series of chemostats with feedback of biomass. The symbols x and s represent the concentrations of biomass and growth-limiting substrate respectively at various points; F, F_s and aF_s are the flow rates at various points; a is the fraction of the liquid flow (F_s), which is fed back $\{F_s = F/(1-a)\}$.

อย่างไรก็ตามสมการโดยทั่วไปสำหรับความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรทที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงในขั้นตอนต่าง ๆ ของลำดับการหมักแบบคงที่ทางเคมียังไม่อาจวิเคราะห์ได้ อัตราความเร็วในการเจือจางทั้งหมดคือ $D = F/wv$ ซึ่ง v คือปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักแต่ละขั้นตอนและ w คือจำนวนของถังหมักหรือขั้นตอนทั้งหมด อัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤตทั้งหมดคือ

$$D_c = \left\{\frac{1-a}{(1-b^{1/w})w}\right\} \mu_m \frac{s_0}{s_0 + K_s} \qquad 6.31$$

ซึ่ง a คือ เศษส่วนของเหลวทั้งหมดที่ไหลผ่านลำดับของถังหมักซึ่งถูกเติมกลับเข้าไปและ b คือเศษส่วนชีวมวลจากขั้นตอนสุดท้าย w ที่ถูกเติมกลับเข้าไป($b = ag$ ซึ่ง g คือปัจจัยความเข้มข้นของชีวมวลที่ได้รับจากเครื่องแยก) s_0 = ความเข้มข้นของซับสเตรทที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในสื่อกลางอาหารเริ่มต้น ขอบเขตจำกัดของ D_c เมื่อ w ถูกทำให้เพิ่มขึ้นอย่างไม่มีสิ้นสุดอาจทำได้โดยใส่ขอบเขต $w \to \infty$ ลงในสมการที่ 6.13 ดังนั้นขอบเขตคือ

$$\lim_{w \to \infty} (1-b^{1/w})w = \log 1/b \qquad 6.32$$



รูปที่ 6.9 Comparison of the steady-state values of the biomass concentrations (x_e) in the effluent from: (M) a series of five chemostats with feedback; (P) an ideal plug-flow culture with feedback; (S) a single chemostat with feedback. $\mu = \mu_m s_0/(s_0 + K_s)$ where s_0 is the concentration of growth-limiting substrate ($= 10K_s$) in the medium added; D = overall dilution rate; Y = growth yield (from Powell & Lowe, 1964); $a \to 0$ means that a is made very small.

และ

$$\lim_{w\to\infty} D_c = \frac{(1-a)}{\log 1/b}\frac{\mu_m s_0}{(s_0+K_s)} \qquad 6.33$$

สมการที่ 6.33 ก็คล้ายกันกับสมการสำหรับอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤตของการหมักแบบปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์ไหลผ่าน (ตอนที่ 4.6.3) Powell และ Lowe(1964) ได้ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์คำนวนหาความเข้มข้นของชีวมวลที่ออกจากขั้นตอนสุดท้าย (x_e) ของลำดับการหมักแบบคงที่ทางเคมีโดยมีการย้อนกลับของชีวมวล รูปที่ 6.9 แสดงผลการทดลองของPowell และ Lowe เปรียบเทียบความเข้มข้นของชีวมวลในสิ่งที่ออกมาจากลำดับการหมักแบบคงที่ทางเคมี การหมักแบบปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์ไหลผ่านที่สมบูรณ์แบบและการหมักแบบคงที่ทางเคมีขั้นตอนเดียวโดยที่ทุกแบบมีการย้อนกลับของชีวมวล ดูเหมือนว่าเมื่อค่าของa ต่ำและค่าของb สูงจะทำให้การใช้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตสมบูรณ์ยิ่งขึ้นในการหมักแบบคงที่ทางเคมีเป็นลำดับตลอดช่วงของอัตราความเร็วในการเจือจางส่วนใหญ่เมื่อเทียบกับการหมักแบบคงที่ทางเคมีขั้นตอนเดียว ข้อได้เปรียบเช่นนี้จะมีมากขึ้นเมื่อซับสเตรตเริ่มต้นมีความเข้มข้นต่ำ ด้วยความเข้มข้นต่ำของซับสเตรตเริ่มต้นอัตราการออกไปสูงสุดของชีวมวลจากลำดับการหมักแบบคงที่ทางเคมีจะมีมากกว่าที่ออกจากการหมักแบบคงที่ทางเคมีขั้นตอนเดียวที่มีการย้อนกลับของชีวมวล ผลลัพธ์ต่าง ๆ ยังแสดงด้วยว่าแม้แต่ระบบซึ่งประกอบด้วยห้าถังหมักต่อกันเป็นลำดับก็มีสภาพใกล้เคียงกันกับการหมักแบบปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์ไหลผ่านที่สมบูรณ์แล้ว

การหมักแบบคงที่ทางเคมีที่ต่อกันเป็นลำดับหลายขั้นตอนพร้อมด้วยการย้อนกลับของชีวมวลได้ถูกบรรยายอย่างละเอียดโดย Kitai และคณะ (1969) ในระบบนี้เป็นที่น่าสนใจสำหรับการเปลี่ยนแปลงซับสเตรตที่มีความเจือจางมาก ๆ ให้เป็นชีวมวลและใช้เป็นเครื่องมือสำหรับทำให้ระบบการหมักแบบปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์ไหลผ่านมีความเป็นจริงหรือสมบูรณ์แบบยิ่งขึ้น.