บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SG1 ด้วยระบบต่อเนื่อง มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์ในปริมาณมาก ในขณะที่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงน้อย พร้อมทั้งให้ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูง ซึ่งจะเป็นการประหยัดทั้งเวลาและต้นทุนในการหมัก นอกจากนี้การสามารถรักษาภาวะที่เหมาะสมนี้ไว้ได้เป็นเวลานาน ๆ ก็จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ยีสต์ดียิ่งขึ้น เนื่องจากจะเป็นการลดขั้นตอนและต้นทุนในการเริ่มต้นผลิตได้อีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้หาภาวะในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ด้วยระบบต่อเนื่องให้มีอัตราการเจริญจำเพาะสูง โดยที่มีผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ และสามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะไว้ได้นาน ๆ ซึ่งผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

ในการติดตามการเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อพบว่าที่ชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือเท่ากับ 0.29 ต่อชั่วโมง ซึ่งในเวลานี้เซลล์ยีสต์มีกิจกรรมสูงสุด จึงมีความพร้อมที่จะปรับตัวให้เข้ากับภาวะในการเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ได้ง่าย ดังนั้นหัวเชื้อที่มีอายุ 8 ชั่วโมงจึงเหมาะสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักต่อไป

สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่เติมและไม่เติมสารเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์ พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ไม่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ เนื่องจากเมื่อพิจารณาองค์ประกอบของกากน้ำตาลจากบทที่ 1 จะพบว่ามีสังกะสี เหล็ก และทองแดงปะปนอยู่ประมาณ 0.2%, 0.1% และ 0.02% (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ (White, 1954) ซึ่งสามารถคำนวณได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสังกะสี เหล็ก และทองแดงปะปนอยู่ 120, 60 และ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่จากการคำนวณสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์โดย Woehrer และ Roehr (Woehrer and Roehr, 1981) พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 500 กรัม ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ ควรใช้สังกะสี เหล็ก และทองแดง 20.5, 25.8 และ 1.4 มิลลิกรัม ซึ่งสามารถคำนวณได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง (มีน้ำตาลเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร) ควรมีสังกะสี เหล็ก และทองแดง 2.05, 2.58 และ 0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เห็นได้ว่าในกากน้ำตาลมีธาตุอาหารเหล่านี้เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์แล้ว ดังนั้นในการหมักจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารทั้ง 3 ชนิดนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับการหาความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น ในขั้นแรกได้ทำการทดลองด้วยการหมักแบบขวดเขย่า ซึ่งผลปรากฏว่าเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้น

ของน้ำตาลเริ่มต้น 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการเจริญจำเพาะและน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องมาจากที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร มีสารอาหารน้อยเกินไปจนกระทั่งอัตราการเจริญจำเพาะถูกจำกัดด้วยปริมาณสารอาหารตั้นต้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 30 กรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่า อัตราการเจริญจำเพาะและน้ำหนักเซลล์แห้งไม่เพิ่มขึ้น แต่มีค่าใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังปรากฏว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลเหลือหลังจากการหมักผ่านไป 12 ชั่วโมง สูงกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องมาจากที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร มีปริมาณสารอาหารตั้งต้นสูงเกินความต้องการของเซลล์ยีสต์ที่ภาวะการหมักนี้ หรืออีกนัยหนึ่งก็คือ แหล่งคาร์บอนไม่เป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญของยีสต์ แต่มีปัจจัยจำกัดอย่างอื่นแทน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์แบบแบชในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่าการหมักให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.21 ต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการหมัก (ตารางที่ 3.4) ในขณะที่การหมักในขวดเขย่า ที่สูตรอาหารเดียวกันให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเพียง 0.16 ต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการหมัก (ตารางที่ 3.3.2) ที่เป็นเช่นนี้แสดงให้เห็นว่า การควบคุมภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ภายในถังหมักเป็นไปได้ดีกว่าการหมักแบบขวดเขย่า

แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ด้วยระบบต่อเนื่อง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นเช่นเดิม และมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ระบบพร้อมทั้งนำน้ำหมักออกจากระบบด้วยปริมาตรที่เท่ากัน เมื่อการหมักเข้าสู่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ ซึ่งอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าเท่ากับอัตราการเจือจางนั้น พบว่าอัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง สามารถให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงสูงที่สุดคือ 2.00 กรัมต่อชั่วโมง นั่นแสดงว่าในการหมักแบบต่อเนื่อง สามารถเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะไปเป็น 0.250 ต่อชั่วโมงได้ ทั้ง ๆ ที่ในการหมักแบบแบชให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเพียง 0.22 ต่อชั่วโมงเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องมาจากมีการเติมสารอาหารให้แก่ระบบตลอดเวลา ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะไม่ถูกจำกัดด้วยปริมาณสารอาหาร นอกจากนี้ยังมีการนำน้ำหมักออกจากระบบ ทำให้การเจริญของยีสต์ไม่ถูกจำกัดด้วยความหนาแน่นของเซลล์ยีสต์ภายในระบบและสารผลิตภัณฑ์ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญก็ไม่ถูกสะสมภายในระบบอีกด้วย เมื่อพิจารณารายงานของ Urbina, Ordaz และ Mayer (Urbina, Ordaz and Mayer, 1997) ในการเปรียบเทียบการเจริญของ *Torulopsis cremoris* ในระบบการหมักแบบแบชและต่อเนื่อง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแลคโตสเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การหมักแบบแบชให้อัตราการเจริญจำเพาะเพียง 0.270 ต่อชั่วโมง ใน

ขณะที่การหมักแบบต่อเนื่องให้อัตราการเจริญจำเพาะถึง 0.289 ต่อชั่วโมง จะเห็นได้ว่าการหมักแบบต่อเนื่องให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าการหมักแบบแบชซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้

เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบจาก 10 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาตรเพิ่มสูงขึ้นด้วย ในขณะที่ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปมีค่าลดลง ซึ่งผลที่ได้ขัดแย้งกับการหมักแบบขวดเขย่าซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่า 20 กรัมต่อลิตร กลับไม่ส่งผลให้มีการเพิ่มปริมาณเซลล์ ทั้งนี้ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าประสิทธิภาพในการควบคุมภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ภายในถังหมักสูงกว่าการหมักแบบขวดเขย่า ดังนั้นปัจจัยจำกัดที่เคยเกิดขึ้นเมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอในการหมักแบบขวดเขย่า ก็อาจจะไม่เป็นปัจจัยจำกัดในการหมักภายในถังหมักก็ได้ ดังนั้นในการหมักภายในถังหมักจึงสามารถเปลี่ยนสารอาหารไปเป็นเซลล์ยีสต์ได้มากกว่าการหมักแบบขวดเขย่า สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลที่เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมเข้าสู่ระบบในการหมักแบบต่อเนื่องคือ 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้สามารถให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงถึง 17.59 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงถึง 0.53 ในขณะที่รายงานของ Johnstone และ Barford (Johnstone and Barford, 1991) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ผสมกับฟลุคโตส 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.23 ต่อชั่วโมง พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าเพียง 11 กรัมต่อลิตร เท่านั้น เห็นได้ว่างานวิจัยนี้ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าถึง 6.6 กรัมต่อลิตร

เป็นที่น่าสังเกตว่า ในการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร แล้วเริ่มใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร เติมเข้าสู่ระบบก่อน จากนั้นจึงเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมเข้าสู่ระบบเป็น 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่า 17.55 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.6.2) ในขณะที่เมื่อเริ่มใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร แล้วใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตรโดยตรง ที่อัตราการเจือจางเดียวกัน น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่า 17.65 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.7.2) ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าไม่ต่างกันมากนัก นั่นแสดงให้เห็นว่าด้วยภาวะเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 แบบนี้ ไม่ส่งผลต่อการเจริญของยีสต์ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ แต่อย่างไรก็ตามการเริ่มต้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 50 กรัมต่อลิตร และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 40 กรัมต่อลิตรโดยตรงนั้น ประหยัดเวลากว่า ดังนั้นภาวะเลี้ยงเชื้อนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับการหมักแบบต่อเนื่องต่อไป

นอกจากแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญแล้ว แหล่งไนโตรเจนก็เป็นปัจจัยที่สำคัญของการเจริญอีกปัจจัยหนึ่ง ซึ่งในหัวข้อที่ 3.12 ในบทที่ 3 ได้แสดงให้เห็นถึงผลของปริมาณไนโตรเจน

ต่อการเจริญของยีสต์ โดยพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้แก่ระบบจาก 1.7172 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 2.4834 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 21.64 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 24.93 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเพิ่มจาก 0.65 ไปเป็น 0.73 อีกด้วย ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแหล่งไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นนอกจากจะส่งผลให้การเจริญของยีสต์ดีขึ้นแล้ว ยังเพิ่มประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนให้ไปเป็นเซลล์อีกด้วย แต่เมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้สูงกว่า 2.4834 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปกลับไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากระบบมีปริมาณไนโตรเจนเกินความต้องการของเซลล์ยีสต์ ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 2.4834 กรัมต่อลิตร หรืออีกนัยหนึ่งคือในสูตรอาหารที่เหมาะสมจะต้องมีแอมโมเนียมซัลเฟต 8.5 กรัมต่อลิตร และมีแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถคำนวณอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ได้เป็น 7.05:1 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Oura (Oura, 1974) ที่พบว่าอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* คือ 7.87:1

ในการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของยีสต์ SG1 มีการรักษาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เติมเข้าสู่ระบบให้คงที่ และแปรความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบเพียงอย่างเดียว ในทางกลับกันการศึกษาผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการเจริญของยีสต์ SG1 มีการจำกัดความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบ และแปรความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เติมเข้าสู่ระบบเพียงอย่างเดียว อาจเป็นไปได้ว่าปัจจัยที่ถูกควบคุมให้คงที่กลับทำหน้าที่เป็นปัจจัยจำกัดแทน จึงส่งผลให้เมื่อเพิ่มปัจจัยที่กำลังทำการศึกษาอยู่กลับไม่ทำให้การเจริญของยีสต์สูงขึ้น ดังนั้นในหัวข้อ 3.13 บทที่ 3 จึงทำการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของทั้ง 2 ปัจจัย เพื่อไม่ให้ปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญของยีสต์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 40 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 60 กรัมต่อลิตร เพิ่มแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 8.5 กรัมต่อลิตรไปเป็น 11.5 กรัมต่อลิตร และเพิ่มแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจาก 2.4 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 3.2 กรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้งจาก 23.58 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 24.47 กรัมต่อลิตร แต่ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้กลับลดลงต่ำลงจาก 0.72 ไปเป็น 0.48 จะเห็นได้ว่าถึงแม้จะสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้แต่ก็ไม่เป็นการได้เปรียบทางด้านต้นทุน

จากที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ สามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ด้วยระบบต่อเนื่องมีอยู่ด้วยกัน 2 สูตรคือ สูตรอาหารตั้งต้นซึ่งประกอบด้วยกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 8.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.4 กรัมต่อลิตร และสูตรอาหารสำหรับเติมเข้าสู่ระบบซึ่งมีสูตรเช่นเดียวกับสูตรอาหารตั้งต้นเพียงแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 40 กรัมต่อลิตร

นอกจากสารอาหารแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีความสำคัญต่อการเจริญด้วย เช่น ออกซิเจน อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง สำหรับอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ SG1 คืออุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 โดยที่อุณหภูมินี้ให้ปริมาณเซลล์และผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงกว่าที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ สำหรับค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 นอกจากจะให้ปริมาณเซลล์และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างสูงหรือต่ำกว่านี้แล้วยังให้ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างอื่น ๆ ด้วย นั่นแสดงให้เห็นว่าในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 จะคุ้มทุนมากกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างอื่น ๆ ส่วนออกซิเจนนั้นระบบจะได้รับจากการกวนและการให้อากาศ โดยที่อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ SG1 คือ อัตราการกวนที่ 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 3 wm เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อให้อัตราการกวนสูงขึ้นน่าจะส่งผลให้ออกซิเจนสามารถละลายในน้ำหมักได้ดีขึ้น แต่จากผลการศึกษาในหัวข้อ 3.8 บทที่ 3 ปรากฏว่า ที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที มีเปอร์เซนต์ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักสูงกว่าที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาทีเพียงเล็กน้อย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากการกวน ทำให้ฟองอากาศที่ผ่านมาจากก้นถังถูกตีจนมีขนาดเล็ก ๆ มากมายส่งผลให้เกิดฟองขึ้นบริเวณผิวหน้าของน้ำหมัก โดยที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที มีฟองเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของน้ำหมักมากกว่าที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาทีมาก ส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทอากาศระหว่างน้ำหมักกับบรรยากาศที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาทีเป็นไปได้ไม่ดีนัก และการเกิดฟองมากทำให้ต้องใช้สารกำจัดฟองในปริมาณที่มากด้วย จึงส่งผลให้ความสามารถในการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักลดลง (Finn, 1967)

ในการทดลองหาสูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่อง ได้ทำการทดลองโดยควบคุมอัตราการเจือจางไว้ที่ 0.250 ต่อชั่วโมง แล้วสังเกตน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ โดยที่ภาวะหรือสูตรอาหารใดที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอมีค่าสูง แสดงว่าภาวะหรือสูตรอาหารนั้นเหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ ถึงแม้การพัฒนาสูตรอาหารและภาวะที่ใช้ในการหมักจะส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอมีค่าสูงมากขึ้นก็ตาม แต่อัตราการเจริญจำเพาะก็ยังถูกควบคุมที่ 0.250 ต่อชั่วโมงเช่นเดิม ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาอัตราการเจริญจำเพาะจึงมีการทดลองเพิ่มอัตราการเจือจางจาก 0.250 ต่อชั่วโมง ไปเป็น 0.290 ต่อชั่วโมง ในหัวข้อ 3.14 บทที่ 3 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอัตราการเจือจางจาก 0.250 ต่อชั่วโมง ไปเป็น 0.290 ต่อชั่วโมง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อชั่วโมงได้ถึงแม้ที่อัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่วโมงใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง ก็ตาม นั่นแสดงให้เห็นว่าการควบคุมอัตราการเจือจางหรืออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ที่ 0.250 ต่อชั่วโมง เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่อง โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ SG1 ด้วยระบบต่อเนื่องโดยใช้สูตรอาหารและภาวะที่ปรับปรุงแล้ว และควบคุมอัตราการเจือจางหรืออัตราการเจริญจำเพาะที่ 0.250 ต่อชั่วโมง ทำให้ได้น้ำหนัก

เซลล์แห้งที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอสูงถึงประมาณ 24 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถคิดเป็น 9.00 กรัมต่อชั่วโมง และให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป 0.72 และยังสามารถรักษาสภาพเหล่านี้ไว้ได้นานถึง 117 ชั่วโมงอีกด้วย โดยในทางทฤษฎีเมื่อพิจารณาสมการเคมีที่แสดงถึงปฏิกิริยาเคมีของการเปลี่ยนสารอาหารไปเป็นเซลล์ยีสต์ ซึ่งเป็นดังนี้ $C_6H_{12}O_6 + NH_4^+ + O_2 \rightarrow C_5H_9O_3N$ (Harrison, 1967) $+ 2H_2O + CO_2 + 3H^+$ จะสามารถสรุปได้ว่า ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ ถ้าต้องการเซลล์ยีสต์ 131 กรัม จะต้องใช้น้ำตาล 180 กรัม คิดเป็นผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปตามทฤษฎีมีค่าเท่ากับ 0.73 ซึ่งเป็นค่าผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงสุดที่น่าจะเป็นไปได้ นั่นแสดงให้เห็นว่าที่ภาวะของการหมักแบบต่อเนื่องที่กล่าวมาข้างต้นเกิดการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นเซลล์ทั้งหมด จึงไม่มีเอธานอลเกิดขึ้นระหว่างการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อใช้ภาวะของการหมักตามที่กล่าวมาแล้วนี้ เมื่อพิจารณารายงานของ Dellweg, Bronn และ Hartmeier (Dellweg, Bronn and Hartmeier, 1977), รายงานของ Meyenburg (Meyenburg, 1969) และรายงานของ Johnstone และ Barford (Johnstone and Barford, 1991) ซึ่งได้กล่าวไว้ว่าเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางมาก ๆ จะทำให้เกิดทั้งกระบวนการหมักและกระบวนการหายใจของยีสต์ ส่งผลให้น้ำตาลบางส่วนเปลี่ยนไปเป็นเอธานอล จึงทำให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปลดต่ำลง โดย Dellweg และคณะ (Dellweg et at., 1977) รายงานว่าอัตราการเจือจางที่สูงที่สุดที่สามารถรักษาผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงสุดไว้ได้คือ 0.18 ต่อชั่วโมง ส่วนรายงานของ Meyenburg (Meyenburg,1969) และรายงานของ Johnstone และ Barford (Johnston and Barford, 1991) รายงานว่าอัตราการเจือจางที่สูงที่สุด ที่ไม่ทำให้เกิดเอธานอลขึ้นระหว่างการหมักคือ 0.23 ต่อชั่วโมง จะเห็นได้ว่าจากการหมักแบบต่อเนื่องด้วยภาวะที่ปรับปรุงแล้วจากงานวิจัยนี้ สามารถทำให้อัตราการเจือจางที่สูงที่สุดที่ไม่ทำให้เกิดเอธานอลขึ้นระหว่างการหมักพัฒนาไปถึง 0.250 ต่อชั่วโมง

สำหรับการศึกษาการนำน้ำหมักกลับมาใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเติมกลับเข้าสู่ระบบอีกครั้ง ผลการทดลองจากหัวข้อที่ 3.15 และ 3.16 ในบทที่ 3 แสดงให้เห็นว่า สามารถนำหนักหมักกลับมาใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเติมเข้าสู่ระบบได้เพียง 1 ครั้งเท่านั้น เนื่องจากในน้ำหมักมีการสะสมของสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ ซึ่งสารเหล่านี้อาจถูกสร้างขึ้นระหว่างการเจริญของยีสต์ หรืออาจเป็นสารที่มีอยู่แล้วในกากน้ำตาลและจะถูกสะสมมากขึ้นเมื่อนำน้ำหมักกลับมาใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่สารยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ส่งผลให้การผลิตน้ำหมักกลับมาใช้เลี้ยงเชื้อใหม่ได้เพียง 1 รอบนั้นจะต้องเป็นสารที่ทนต่อความร้อน ซึ่งสารนี้น่าจะเป็นประโยชน์กับอุตสาหกรรมที่ไม่ต้องการให้มีการปนเปื้อนของยีสต์ เช่นอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล ดังนั้นการศึกษาการนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่นี้ น่าจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการป้องกันการปนเปื้อนของยีสต์ในอุตสาหกรรมได้