บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยทั่ว ๆ ไป ต้องมีปัจจัยที่จำเป็นและสำคัญ คือ จุลินทรีย์ สารอาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง การให้อากาศ และเครื่องหมัก รวมไปถึงวิธีหรือรูปแบบที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุด นั่นคือ ได้ปริมาณเอทานอลที่สม่ำเสมอ และสูงสุด ใช้เวลาหมักสั้นที่สุด (อัตราส่วนของปริมาณเอทานอลต่อระยะเวลาหมักสูงสุด) ใช้วิธีการที่ง่ายสะดวกต่อการทำงาน การซ่อมแซมบำรุงรักษา และมีความประหยัด ซึ่งจะได้กล่าวถึงปัจจัยบางปัจจัยที่จะทำการศึกษา เฉพาะในการทำงานวิจัยครั้งนี้เท่านั้น

2.1 ชนิดของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ เป็นสิ่งมีชีวิตเซลเดียว มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกับเซลสัตว์ชั้นสูง และสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีคล้ายกันหลายปฏิกิริยา สามารถดำรงชีพโดยใช้สารอาหารอย่างง่าย ๆ เช่น เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) อย่างเดียว หรือผสมกับน้ำตาลเฮ็กโซส (hexose)

จุลินทรีย์มีหลายชนิดด้วยกัน จัดจำแนกได้หลายแบบ ในที่นี้จะจัดแบ่งออกเป็น 4 ชนิด (Aiba et al., 1968) ดังนี้ :-

1. Bacteria
2. Viruses including bacteriophages
3. Fungi including yeasts and Actinomycetes
4. Unicellular algae

จุลินทรีย์แต่ละชนิด มีคุณสมบัติแตกต่างกันในช่วงที่กว้างมาก เช่น ความแตกต่างของส่วนประกอบทางเคมี ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบทางเคมี จำนวนประชากร และน้ำหนักแห้งของจุลินทรีย์ 4 ชนิด (โดยเฉลี่ย) (Aiba et al., 1968)

จุลินทรีย์	ส่วนประกอบทางเคมี (100 % โดยน้ำหนักแห้ง)			จำนวนประชากร (เซล/มล.)	น้ำหนักแห้ง (ต่อ 100 มล.)	หมายเหตุ
	โปรตีน	กรดนิวเคลีย์	ไขมัน			
Viruses	50-90	5-50	<1	10^{8}-10^{9}	0.0005*	อัตราส่วน Lipoprotein sheath อาจมีไขมัน 25%
Bacteria	40-70	13-34	10-15	$2x10^{8}$-$2x10^{11}$	0.02-2.9	Mycobactrium sp อาจมีไขมัน 30%
Filamentous	10-25	1-3	2-7		3-5	Aspergillus sp และ Penicllium sp บางชนิดมีไขมัน 50%
Yeast	40-50	4-10	1-6	$1-4x10^{8}$	1-5	Rhodotorula sp และ Candida sp บางชนิดมีไขมัน 50%
Small unicellular algae	10-60 (50)	1-5 (3)	4-80 (10)	$4-8x10^{7}$	0.4-0.8	ค่าในวงเล็บเป็นค่าเฉลี่ย

* Virus มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 200 nm.

2.2 จุลินทรีย์ที่สำคัญที่ใช้ในกระบวนการหมัก

ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล จุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุด คือ ยีสต์ ซึ่งเป็นพวกราแท้ (true fungi) ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในชั้น แอสโคไมซีตีส (Class Ascomycetes) ไม่มีคลอโรฟิลล์ มีนิวเคลียส เคลื่อนไหวไม่ได้ รูปร่างกลมรี หรือรูปไข่ มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย คือ ยาวประมาณ 20 ไมครอน มียีสต์อีกหลายชนิดเหมือนกันที่มีรูปร่างลักษณะแตกต่างไปจากที่กล่าวแล้ว ตัวอย่างเช่น ยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมปัง ทำเบียร์ มีการสร้างแอสโคสปอร์ เมื่อ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขยายพันธุ์ เป็นพวกเซลเดียว ส่วนมากขยายพันธุ์ได้โดยการแตกหน่อ (budding) เซลยีสต์ที่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะแตกหน่อเป็นลองเซลได้ ภายใน 1-2 ชั่วโมง ดังรูปที่ 2.1 โดยทั่วไปต้องการอุณหภูมิในการเติบโตอยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรด-ด่างที่ชื้นได้อยู่ระหว่าง 3.5 เจริญได้ทั้งในสภาพมีอากาศและไม่มีอากาศ ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมัก Lodder จำแนกยีสต์ไว้ 39 จีนัส จำนวน 349 สปีชี่ มีเพียง 2 จีนัส ที่มีบทบาทโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการหมัก คือ Saccharomyces และ Candida (Prescott และ Dunn, 1959) ตัวอย่างเช่น Saccharomyces cerevisiae หรือเรียก distiller's yeast เหมาะในการใช้หมักแอลกอฮอล์ เชื้อนี้นอกจากจะเจริญเติบโตได้เร็วแล้ว ยังสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้มากอีกด้วย ยีสต์นี้สามารถหมักน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้เป็นเอทานอล (ตามทฤษฎีจะได้ 51.1 % โดยน้ำหนัก) และคาร์บอนไดออกไซด์ (ตามทฤษฎีจะได้ 48.9 % โดยน้ำหนัก) ในการทำเหล้าสาเกของญี่ปุ่น คือไวน์ที่ทำจากข้าว ใช้ยีสต์หมักข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อรา ยีสต์ที่ใช้คือ Saccharomyces sake ซึ่งเป็นสายพันธุ์พิเศษของ Saccharomyces cerevisiae นั่นเอง และในกระบวนการผลิตกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม Saccharomyces cerevisiae สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเฮกโซสประมาณ 10-24 % ให้กลายเป็นกลีเซอรอลได้ โดยทั่วไปยีสต์จะหมักได้แอลกอฮอล์สูงประมาณร้อยละ 12-14 แต่ในบางครั้งอาจได้แอลกอฮอล์สูงถึงร้อยละ 18-19 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์และสภาพแวดล้อมด้วย อย่างเช่น ใช้ Saccharomyces cerevisiae (เบเกอร์ คอมเพรสยีสต์) หมักจะได้แอลกอฮอล์ร้อยละ 15.1 แต่เมื่อใช้ Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus (Burgundy strain) จะได้แอลกอฮอล์ร้อยละ 18.4 โดยปริมาตร (Costor, 1954)

เซลยีสต์มีส่วนประกอบดังนี้ ความชื้นร้อยละ 68-83 คาร์โบไฮเดรทอยู่ในรูปกลูแคนและแมนแนน ไนโตรเจนโดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 7-9 ของน้ำหนักเซลแห้ง สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ โปรตีน (64-76 % ของไนโตรเจนทั้งหมด) โดยปกติโปรตีนจะเชื่อมต่อกับแมนแนน ฟิวรีนส์ ไพรีมิดีนส์ กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น ไขมัน วิตามิน และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ส่วนมากได้แก่ ฟอสเฟต

ในสภาพที่ไม่มีอากาศ น้ำตาลกลูโคสผ่านเข้าสู่ภายในเซลด้วยระบบขนส่งที่ผนังเซล และการหมักเกิดในไซโตปลาสม กลูโคสจะเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคลิซิส Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof pathway, EMP) รายละเอียดดูได้ในภาคผนวก ข เมื่ออาหารขาดแหล่งไนโตรเจน ยีสต์จะไม่เจริญเติบโต ยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสบางส่วนไปเก็บสะสมไว้ภายในเซล

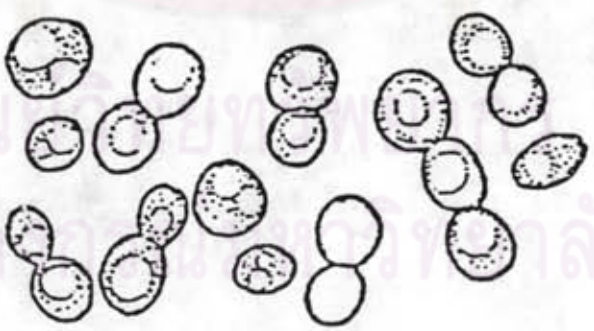
ในสภาพที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน S. cerevisiae ที่อยู่ในระยะพักตัวจะเปลี่ยนน้ำตาลร้อยละ 70 ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ ส่วนน้ำตาลที่เหลืออีกร้อยละ 30 ยีสต์เก็บสะสมไว้

ผลผลอยได้จากการหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ได้ประมาณร้อยละ 95 และยีสต์ยังสร้างสารอื่น ๆ ได้อีกด้วย เช่น กลีเซอรอล กรดซัคซินิค แอลกอฮอล์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ กรดซิตริก และกรดแลคติก เป็นต้น

ส่วนในสภาพที่มีการให้อากาศ ผลที่ได้ในขั้นสุดท้ายจากวัฏจักร EMP ก็จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) จากนั้นจะถูกออกซิไดส์ โดยการผ่านอีเลคตรอนเข้าไปในลูกโซ่การหายใจ หรือลูกโซ่การขนส่งอีเลคตรอน รายละเอียดดูในภาคผนวก ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CBS, 1395



CBS, 1171

รูปที่ 2.1 รูปร่างของ Saccharomyces cerevisiae ที่เลี้ยงใน malt extract 3 วัน

ยีสต์เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการหมัก โดยเฉพาะกระบวนการหมักที่มีแอลกอฮอล์เกิดขึ้นตามสมการ

$$\underset{\text{กลูโคส}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{เอทานอล}}{2C_2H_5OH} + 2CO_2 \quad \Delta G = -56 \text{ กิโลคารลอรี่}$$

Saccharomyces cerevisiae นอกจากจะมีคุณสมบัติในการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแล้ว ยีสต์ยังมีเมตาบอลิสึมการหายใจอีกด้วย คือในสภาพที่มีออกซิเจนสามารถออกซิไดส์กลูโคส ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \qquad \Delta G = -688 \text{ กิโลคาลอรี่}$$

ปฏิกริยาต่าง ๆ ของยีสต์ที่เกิดขึ้นในเซล ขึ้นอยู่กับสภาวะในการเจริญเติบโต ยีสต์สามารถเปลี่ยนจากกระบวนการหมักเป็นกระบวนการหายใจให้พลังงานมากกว่ากระบวนการหมัก ดังรูปที่ 2.2

รูปที่ 2.2 เปรียบเทียบการย่อยสลายในสภาพที่ไม่มีอากาศ และในสภาพที่มีการให้อากาศโดยยีสต์ (Lehninger, 1975)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 โภชนาการของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารและสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ ได้แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ทุกชนิดมีความต้องการน้ำ, แหล่งพลังงาน, คาร์บอน, ไนโตรเจน และเกลือแร่บางอย่าง ส่วนออกซิเจนนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

2.3.1 แหล่งพลังงาน

เนื่องจากการเจริญ เป็นกระบวนการที่จำเป็นต้องใช้พลังงาน เพื่อนำมาสังเคราะห์ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซล จุลินทรีย์อาจได้พลังงานจากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้

(1) พวก autotrophic micro-organisms เช่น สาหร่ายเซลเดียว และแบคทีเรียบางชนิด สามารถใช้แสงแดดเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งพลังงาน ก็สามารถที่จะสังเคราะห์แสงได้

(2) พวก chemo-autotrophic micro-organisms เช่น พวกแบคทีเรียในตระกูล Thiobacillus, Nitrosomonas, Nitrobacter, Hydrogenomonas และ Desulfevibrio สามารถออกซิไดส์สารประกอบอนินทรีย์บางอย่างเพื่อนำพลังงานที่เกิดขึ้นมาใช้ได้

(3) พวก heterotrophic micro-organisms จุลินทรีย์เกือบทั้งหมดในอุตสาหกรรมการหมักจัดอยู่ในจำพวกนี้ ซึ่งจะได้พลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์เท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกแป้งและน้ำตาล

2.3.2 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุ ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซล ปกติแล้วจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จัดเป็นพวก heterotroph ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงาน ได้จากแหล่งคาร์บอนไปด้วย ในขณะที่พวก autotrophic micro-organisms สามารถใช้กระบวนการสังเคราะห์แสงนำเอาคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้สร้างสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ แก่เซลได้

ในการเมตาโบไลส์ของจุลินทรีย์ ที่มีการใช้ออกซิเจนอย่างเต็มที่ จะพบว่าประมาณร้อยละ 50-55 ของคาร์บอนในสารอาหารที่ใช้ไป จะนำไปใช้สร้างเป็นองค์ประกอบของเซล และเนื่องจากเซลประกอบด้วยคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง อาจใช้คำนวณหาปริมาณของสารประกอบคาร์บอน ที่จำเป็นต้องให้แก่จุลินทรีย์ได้ เช่น ถ้าต้องการปริมาณเซล คิดเป็นน้ำหนักแห้ง 40 กรัม/ลิตร ปริมาณคาร์บอนที่ต้องใช้โดยประมาณ จะเป็น 40/2+100/50 เท่ากับ 40 กรัม/ลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณของน้ำตาลเฮกโซสที่ต้องใช้ประมาณ 100 กรัม/ลิตร

2.3.3 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปแบบง่าย ๆ สำหรับนำไปสร้างเอนไซม์ และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลได้ เช่น แอมโมเนีย, เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท เป็นต้น แต่บ่อยครั้งที่เราจะพบว่าจุลินทรีย์ต้องการสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนบางอย่าง เพราะมันไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง เช่น กรดอะมิโนบางตัวและสารพวกที่มีโครงสร้างหลักเป็น purine และ pyrimidine ซึ่งสารพวกนี้อาจได้จากพวก หางนม, แป้งถั่วเหลือง, yeast extract เป็นต้น

ปกติแล้ว เซลของจุลินทรีย์ประกอบด้วย ไนโตรเจน โดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลนี้สำหรับการคำนวณหาปริมาณขั้นต่ำของสารอาหารที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนให้เพียงพอแก่การเจริญของมันตามต้องการได้

2.3.4 แหล่งเกลือแร่

ถึงแม้เชื้อจุลินทรีย์จะต้องการสารเกลือแร่หลายชนิดในปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่ก็มีความจำเป็นต่อจุลินทรีย์ เพราะเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาชีวเคมีหลายอย่าง และยังเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ และองค์ประกอบบางอย่างของเซลอีกด้วย P และ Mg จัดว่าจำเป็นมากที่จะต้องมีอยู่ในสารอาหาร เพราะเป็นตัวเร่งในปฏิกริยาการสร้างและถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ โดยทั่วไปพบว่าจุลินทรีย์ต้องการธาตุ P, Mg, Ca, K, S และ Na ในปริมาณมากพอสมควรเรียกพวกนี้ว่า major elements ส่วน Fe, Co, Cu, Mn, Zn, Me และ B เรียกว่า minor หรือ trace elements เพราะจุลินทรีย์ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งมักไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในอาหาร เนื่องจากมีปะปนมากับวัตถุดิบหลายชนิดที่นำมาใช้อยู่แล้ว

2.3.5 แหล่งอาหารเสริม

จุลินทรีย์หลายชนิดไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน หรือวิตามินบางอย่างได้ เช่น lysine, methionine, B-group vitamins, pantothenic acid, folic acid และ biotin เป็นต้น ดังนั้นถ้าต้องการให้จุลินทรีย์เจริญได้และให้ผลผลิตอย่างมีประสิทธิภาพแล้ว จะต้องศึกษาความต้องการทางด้านนี้ของจุลินทรีย์ และเติมลงไปในสารอาหารเท่าที่จำเป็น

2.4 <u>วัตถุดิบที่ใช้ประกอบสูตรสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์</u>

การคัดเลือกชนิดวัตถุดิบ เพื่อนำมาประกอบเป็นสูตรสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ มีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนกว่าการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการหมักชนิดนั้น ๆ โดยต้องทำการศึกษาทดลองอย่างละเอียดเพื่อดูความเหมาะสมหลาย ๆ ด้าน จนให้ได้สูตรสารอาหารสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมการหมักที่ให้ผลตอบแทนสูงสุด ซึ่งจำเป็นต้องพิจารณาหลายด้านประกอบกันไป เช่น ความเหมาะสมของสารอาหารที่อยู่ในวัตถุดิบที่นำมาใช้ ราคา และปริมาณที่มีในระหว่างปี ตลอดจนความสะดวกในการควบคุมมาตรฐานของสูตรสารอาหารให้มีสัดส่วนขององค์ประกอบต่าง ๆ สมดุลตามต้องการ

โดยทั่วไปนิยมใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย ดังนั้น ในอุตสาหกรรมการหมักชนิดเดียวกันก็อาจใช้วัตถุดิบชนิดต่างกัน แต่สามารถใช้ทดแทนกันได้เป็นบางส่วน หรือทั้งหมด เช่น การใช้กากน้ำตาลจากอ้อยแทนกากน้ำตาลจากหัวบีท การใช้เด็กซ์ตรินแทนกลูโคส เป็นต้น ปกติแล้ววัตถุดิบส่วนใหญ่ได้มาจากผลิตผล และผลพลอยได้ทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ มันฝรั่ง มันสำปะหลัง ผลไม้ (เช่น ส้บปะรด) รำ ซังข้าวโพด ฟาง และชานอ้อยเป็นต้น หรือผลิตภัณฑ์จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น น้ำตาลกลูโคส วิตามิน และกรดอะมิโน รวมทั้งผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมหลายอย่าง เช่น กากน้ำตาล(molasses) หางน้ำนม(whey waste) น้ำแช่ข้าวโพด(cornsteep liquer) น้ำทิ้งจากการทำเยื่อกระดาษ(sulfite waste liquer) และสารไฮโดรคาร์บอนจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม เป็นต้น

วัตถุดิบและสัดส่วนที่นำมาใช้ประกอบสูตรสารอาหาร สำหรับจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมการหมักชนิดหนึ่ง ๆ มักถูกปกปิดเป็นความลับของโรงงาน ถึงแม้ว่าจะค่อนข้างยุ่งยากแต่ถ้าหากศึกษาจากทางชีวเคมี และองค์ประกอบต่าง ๆ ของวัตถุดิบแต่ละชนิดโดยละเอียดแล้ว ก็สามารถ

ที่จะนำมาประกอบสูตรสารอาหารแบบต่าง ๆ สำหรับทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ เพื่อหาสูตรเหมาะสมที่จะให้ประสิทธิภาพสูงในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ในที่นี้ จะกล่าวถึงวัตถุดิบบางอย่างที่นิยมใช้กันพอสังเขป ดังต่อไปนี้

2.4.1 กากน้ำตาล (molasses)

กากน้ำตาลที่ได้จากโรงงานน้ำตาลจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ราคาถูก และใช้กันมากในอุตสาหกรรมการหมัก ได้จากการทำน้ำตาลทรายจากอ้อย มีส่วนประกอบเป็นน้ำตาลโดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 52 (sucrose ร้อยละ 30 และ invert sugars ร้อยละ 22), เถ้าร้อยละ9.8 , สารอินทรีย์อื่น ๆ ร้อยละ 19.6 , และน้ำร้อยละ 16.0 ส่วนกากน้ำตาลที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำตาลจากหัวบีท มีองค์ประกอบที่แตกต่างไปกล่าวคือมี ซูโครสร้อยละ 48.5 , invert sugar ร้อยละ 1.0, raffinose ร้อยละ 1.0 , เถ้าร้อยละ 10.8 , สารอินทรีย์อื่นๆ ร้อยละ 20.7 และน้ำ ร้อยละ 18.0 แต่มีไบโอทินในปริมาณต่ำกว่ากากน้ำตาลจากอ้อยหลายเท่า อย่างไรก็ตามส่วนประกอบในกากน้ำตาลที่นำมาใช้อาจแตกต่างไปจากข้อมูลที่กล่าวไปบ้างพอสมควรทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งผลิต กรรมวิธีการผลิต และสภาวะการเก็บรักษา แต่เนื่องจากกากน้ำตาลมีสารหลายชนิดที่ยับยั้งการเจริญและการหมักของเซลยีสต์ ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการหมัก เป็นเหตุให้การหมักดำเนินไปได้ช้า อย่างเช่น การหมักแอลกอฮอล์ของโรงงานสุราทั่วไป ใช้เวลาหมักถึง 50 ชั่วโมง อีกทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักยังไม่ทันสมัย ทำให้ประสิทธิภาพการหมักต่ำ ต้นทุนการผลิตแอลกอฮอล์จากการน้ำตาลจึงสูง

2.4.2 มันสำปะหลัง (cassava)

แม้ว่าประเทศไทยจะผลิตมันสำปะหลังได้ปริมาณมากและสามารถนำมาใช้ผลิตแอลกอฮอล์ได้ก็ตาม แต่การพิจารณาเพื่อเลือกวัตถุดิบเหมาะสมที่จะนำมาหมักแอลกอฮอล์นั้น จะต้องคำนึงถึงกระบวนการผลิตด้วย เนื่องจากกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง ต้องมีหลายขั้นตอน ยุ่งยากมาก และทำให้ต้องมีการลงทุนสูง อย่างเช่น ต้องเพิ่มกระบวนการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล ดังนั้น ทำให้ต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับสารเคมีและเอนไซม์สูง อีกทั้งยังต้องเติมเกลือแร่ วิตามิน ลงไปเพื่อช่วยในการเจริญของยีสต์เป็นปริมาณมากเพราะมันสำปะหลังขาดธาตุอาหารที่สำคัญหลายอย่าง ใช้เวลาหมักนาน 36-48 ชั่วโมง จึงจะได้แอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 6-12 จึงทำให้การผลิตแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังยังไม่เป็นที่แพร่หลาย แต่จะทำได้ในอนาคต ส่วนการผลิตแอลกอฮอล์จากข้าวโพด และมันเทศก็เช่นเดียวกัน ต้นทุนของแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้จากข้าวโพด หรือมันสำปะหลังสูง

2.4.3 น้ำอ้อย (sugar-cane juice)

น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งสามารถนำมาหมักได้ทันที และหมักได้เร็ว ทั้งนี้เพราะน้ำอ้อยมีสารอาหารอยู่มากพอต่อการเจริญเติบโตและการหมักของยีสต์ และต้องการอาหารเสริมเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนประกอบของน้ำอ้อยจากตารางที่ 2.2-2.6 อย่างไรก็ตามอ้อยมีฤดูหีบที่สั้นเพียง 4 เดือนเท่านั้น ซึ่งไม่เพียงพอต่อการป้อนโรงงานได้ตลอดปี ดังนั้นช่วงเวลาที่เหลือก็จะต้องใช้วัตถุดิบจากแหล่งอื่นมาทดแทนในการหมัก

2.4.4 น้ำสับปะรด (pineapple juice)

วัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่เหมาะสมสามารถนำมาหมักแอลกอฮอล์ได้คือ น้ำสับปะรด ซึ่งกำลังอยู่ระหว่างการวิจัยในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะของเสียจากโรงงานสับปะรด สับปะรดมีน้ำตาลชนิดที่ยีสต์สามารถใช้ได้ ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลจากน้ำสับปะรดให้เป็นแอลกอฮอล์ได้โดยตรง สำหรับประเทศไทยมีการปลูกสับปะรดกันมาก และได้ผลดี ปลูกได้ในที่ดินเกือบทุกแห่ง ไม่ต้องการดินดีนัก เจริญงอกงามในดินค่อนข้างเป็นกรด ระหว่าง pH 4.5-5.5 โดยเฉพาะที่จังหวัดชลบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เมื่อใช้ป้อนโรงงานสับปะรดกระป๋องซึ่งมีเป็นจำนวนมาก ไม่น้อยกว่า 13 โรง เนื่องจากสินค้าอุตสาหกรรมในรูปของสับปะรดกระป๋องทำรายได้ให้แก่ประเทศที่สำคัญอย่างหนึ่งหนึ่ง ผลพลอยได้จากการผลิตสับปะรดกระป๋อง ได้แก่ น้ำล้างสับปะรด เปลือก แกน และสับปะรดไม่ได้ขนาดเป็นจำนวนมาก พอที่จะนำมาเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้ โดยเฉพาะน้ำสับปะรดที่ได้จากเปลือกทำให้มีน้ำตาลเข้มข้นขึ้นโดยใช้วิธี Reverse osmosis ซึ่งกำลังอยู่ระหว่างการทดลอง สำหรับส่วนประกอบของน้ำสับปะรดจะแตกต่างกันไปขึ้นกับเนื้อที่ในการเพาะปลูก สภาพดินฟ้าอากาศ ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2.3 น้ำตาลฟรุคโตสร้อยละ 1.4 และน้ำตาลซูโครสร้อยละ 8.0 นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ อีก เช่น ไทเอมิน ไรโบฟลาวิน วิตามินบี 6 และโปตัสเซียม มีความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง pH 3.3-3.7 ส่วนประกอบทางเคมี แร่ธาตุ และวิตามินของน้ำสับปะรดแช่แข็งและสับปะรดปนในเมืองไทย ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.7 และ 2.8 น้ำตาลซูโครสในน้ำสับปะรดจะสลายได้ง่าย ทำให้กลายเป็นกลูโคสและฟรุคโตส ซึ่งอาจถูกเร่งให้เกิดเร็วขึ้นได้โดยเอนไซม์จากยีสต์ อย่างไรก็ตามในการหมักแอลกอฮอล์ ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ได้ดีพอ ๆ กัน เมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบของน้ำสับปะรดจากตาราง 2.7 และ 2.8 จะเห็นว่า ในน้ำสับปะรดมีสารอาหารอยู่มากพอต่อการเจริญเติบโตและการหมักของเซลยีสต์ และต้องการสารอาหารเสริมในรูปของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแมกเนเซียม เสริมอีกเพียงเล็กน้อย การหมัก

ก็สมบูรณ์ อย่างเช่น การผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำสับปะรดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อใด ๆ ผลจากการหมักจะได้แอลกอฮอล์ประมาณ 11 % โดยปริมาตร ในเวลาการหมักเพียง 22 ชั่วโมง (นีคม , 2523) ด้วยเหตุนี้ จึงได้ดำเนินการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำสับปะรดด้วยเครื่องหมักแบบคอลัมน์ ต่อจากงานก่อน ซึ่งเป็นงานที่ต่อเนื่อง เมื่อการผลิตเอทานอลจากน้ำสับปะรดในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ได้ผลดี ก็สามารถนำของเสียจากโรงงานสับปะรดกระป๋องมาเป็นวัตถุดิบแทนน้ำสับปะรดได้ โดยนำข้อมูลจากน้ำสับปะรดมาประกอบการพิจารณา ในการทดลองผลิตแอลกอฮอล์จากของเสียจากโรงงานสับปะรดกระป๋องนั้นย่อมก่อให้เกิดผลดีขึ้นมาก นอกจากจะให้ประโยชน์ในด้านการกำจัดของเสียจากโรงงาน และเพิ่มรายได้ให้กับโรงงานแล้ว ยังได้มีการปรับปรุงเทคโนโลยีทางด้านเครื่องหมัก ในการผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำสับปะรดด้วย ซึ่งสามารถนำไปใช้กับวัตถุดิบทางเกษตรอื่น ๆ ได้

2.4.5 แหล่งอาหารเสริมและวิตามิน

จุลินทรีย์หลายชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ต้องการสารอาหารเสริมบางอย่างเพื่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพตามต้องการ ตารางที่ 2.9 แสดงให้เห็นถึงสารอาหารเสริมที่สำคัญ และแหล่งวัตถุดิบที่อาจนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการเติมสารอาหารเสริมลงในสูตรสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15564

ตารางที่ 2.2

Composition of Sugar Cane and of Juice Solids

Approximate ranges of normal concentrations of the principal constituents in extracted raw juice solids.

Constituent	Percent	
Water	73–76	
Solids	24–27	
Fiber (dry)	11–16	
Soluble solids	10–16	Percent of Soluble Solids
Juice constituents		
Sugars	75–92	
Sucrose		70–88
Glucose		2–4
Fructose		2–4
Salts	3.0–7.5	
Of inorganic acids		1.5–4.5
Of organic acids		1.0–3.0
Free organic acids	0.5–2.5	
Carboxylic acids		0.1–0.5
Amino acids		0.5–2.0
Other organic non sugars		
Protein		0.5–0.6
Starch		0.001–0.050
Gums		0.30–0.60
Wax, fats, phosphatides		0.05–0.15
Unidentified non sugars		3.0–5.0

George P. Meade, "Cane Sugar Handbook", 1929, p 23-33

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3

Concentrations of Mineral Constituents

Mineral content and sulphated ash of factory syrup solids (South Africa) *

Constituent	Percent Refract. Solids		
	Min.	Aver.	Max.
Potassium (K_2O)	0.63	0.90	1.50
Calcium (CaO)	0.26	0.35	0.57
Magnesium (MgO)	0.10	0.25	0.32
Sulphate (SO_4)	0.52	0.61	0.73
Chloride (Cl)	0.31	0.46	0.61
Silica (SiO_2)	0.016	0.069	0.106
Phosphate (P_2O_5)	0.001	0.020	0.050
Iron (Fe_2O_3)	0.003	0.006	0.010
Sulphated ash	2.50	3.43	4.06
Equivalent salts (inc. organic acids)	3.43	4.15	5.03

* Graham *et al.*, *Proc. 53rd Ann. Conf.*, So. Afr. Sug. Tech. Assoc., March 1959, p. 65

ตารางที่ 2.4

Concentrations of Certain Mineral Constituents in Raw and Clarified Juice Solids (Louisiana) *

Constituent	Percent Dry Solids					
	Raw Juices			Clarified Juices		
	Min.	Aver.	Max.	Min.	Aver.	Max.
Calcium (CaO)	0.15	0.20	0.29	0.19	0.30	0.45
Magnesium (MgO)	0.22	0.28	0.38	0.11	0.16	0.22
Sulphate (SO_3)	0.25	0.52	0.93	0.10	0.41	0.73
Chloride (Cl)	...	...	...	0.12	0.22	0.36
Phosphate (P_2O_5)	0.12	0.40	0.62	0.03	0.08	0.15
Silica (SiO_2)	0.34	0.71	1.07	0.10	0.14	0.18
Carbonated Ash (silica free)	1.70	3.64	5.35	1.51	3.55	5.28

* Fort and Smith, *Sug. J.*, December 1952, p. 34.

ตารางที่ 2.5

Concentrations of Organic Acids in Raw Juice Solids (Louisiana) *

Acid	Percent Dry Solids		
	Aver.	Min.	Max.
Carboxylic			
Aconitic	1.54	1.00	2.06
Citric	0.18	0.12	0.30
Malic	0.12	0.03	0.25
Oxalic	0.11	0.02	0.16
Glycolic	0.05	trace	0.13
Mesaconic	0.04	trace	0.08
Succinic	0.02	trace	0.05
Fumaric	<0.01	trace	0.04
Syringic	trace	trace	<0.01
Amides			
Asparagine	0.71	0.30	1.36
Glutamine	0.19	0.07	0.38
Amino acids			
Aspartic	0.11	0.07	0.16
Glutamic	0.05	trace	0.10
Alanine	0.06	0.01	0.18
Valine	0.03	trace	0.07
Threonine	0.02	trace	0.04
γ-Aminobutyric	0.03	trace	0.07
Isoleucine	0.01	trace	0.05
Glycine	<0.01	trace	0.03
Leucine, lysine, serine, arginine, phenylalanine, tyrosine, histidine, proline	Only traces of these 8 amino acids found in majority of juices		

* Roberts and Martin, BCRP, 1959, p. 67; cf. *Sug. J.*, April 1960

ตารางที่ 2.6

Concentrations and Composition of Protein in Raw Juice Solids (Louisiana) *

Protein	Percent Dry Solids		
	Min.	Aver.	Max.
Total protein	0.46	0.49	0.53
Amino acids (free acid basis)			
Glutamic (or glutamine)	0.064	0.076	0.087
Aspartic (or asparagine)	0.055	0.061	0.071
Leucine	0.051	0.053	0.071
Alanine	0.037	0.047	0.055
Lysine	0.038	0.043	0.051
Valine	0.036	0.040	0.044
Glycine	0.034	0.039	0.047
Threonine	0.029	0.036	0.048
Serine	0.020	0.032	0.038
γ-Aminobutyric	0.030	0.031	0.033
Isoleucine	0.027	0.030	0.033
Arginine	0.024	0.025	0.030
Phenylalanine	0.022	0.025	0.030
Tyrosine	0.016	0.021	0.021
Histidine	0.008	0.014	0.030
Proline	0.001	0.007	0.013

* Roberts and Martin, BCRP, 1959, p. 67.

ตารางที่ 2.7 ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำสับปะรดแช่แข็ง [1] และน้ำสับปะรดในเมืองไทย [2] โดยเฉลี่ย (คิดเป็นร้อยละ)

ส่วนประกอบ ร้อยละ	น้ำสับปะรดแช่แข็ง จำนวน	สับปะรดปน จำนวน
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	13.8	
ปริมาณเถ้า	0.35	
	0.03	0.03
โปรตีน	0.41	0.4
ปริมาณเสี้ยน	0.11	0.5
คาร์โบไฮเดรททั้งหมด	13.0	14.0
พลังงาน (แคลอรี่ต่อ 100 กรัม)	49.0	54.0

[1] D.K. Tressler, and M.A. Joslyn, Fruit and Vegetable Juice Processing Technology (Westport, Connectient : The A Publishing Company, Inc., 1971), p. 175.

[2] รายงานการสำรวจสภาพการทำไร่สับปะรดในเขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (เอกสารวิชาการที่ 2, กรมส่งเสริมการเกษตร, 2513) หน้า 10-11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.8 ปริมาณแร่ธาตุและวิตามินในน้ำสับปะรดแช่แข็ง [1] และน้ำสับปะรดในเมืองไทย [2] โดยเฉลี่ย

องค์ประกอบ	น้ำสับปะรดแช่แข็ง จำนวนมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม	สับปะรดปน จำนวนมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
แร่ธาตุ		
แคลเซียม	10.8	22.0
เหล็ก	0.32	0.4
ฟอสฟอรัส	8.3	8.0
แมกเนเซียม	8.9	-
โปตัสเซียม	143.0	-
โซเดียม	0.8	-
วิตามิน		
กรดแอสคอร์มิค	13.0	17.0
บีตาคาโรติน (ไอยู)	0.009	15.0 (ไอยู)
กรดโฟลิค	0.001	-
กรดแพนโทเทนิค	0.125	-
ไรโบฟลาวิน (บี2)	0.126	0.04
ไทอะมีน (บี1)	0.066	0.09
ไพริดอกซิน (บี6)	0.074	-
ไนอาซิน	0.25	0.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.9 สารอาหารเสริมบางอย่างที่จำเป็นสำหรับโภชนาการของจุลินทรีย์และวัตถุดิบที่อาจนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารเสริม (วิชาพงษ์, 2525)

สารอาหารเสริม	สภาพทางเคมีที่ทำหน้าที่ได้ดี	วัตถุดิบที่อาจใช้เป็นแหล่งสารอาหารเสริม
วิตามินบี 1	Thiaminopyrophosphate	รำข้าว, ยีสต์และเชื้อข้าวสาลี (wheat germ)
วิตามินบี 2	(i) Flavin mononucleotide	ธัญญพืช
	(ii) Flavin adenine denucleotide	น้ำแช่ข้าวโพด
วิตามินบี 6	Pyridoxal phosphate	ไมซีเลียมของเชื้อรา Penicillium, ยีสต์, รำข้าว, ข้าวโพด, ข้าวสาลี และน้ำแช่ข้าวโพด
กรดนิโคตินิค	(i) Nicotinamide adenine dinucleotide	ไมซีเลียมของเชื้อรา Penicillium
	(ii) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ข้าวสาลีและตับ
	(iii) Nicotinamide mononucleotide	
กรดแพนโทเธนิค	Coenzyme A	กากน้ำตาลจากหัวบีท, ไมซีเลียมของเชื้อรา Penicillium และน้ำแช่ข้าวโพด
วิตามินบี 12	Cyanocobalamin	ตับ, ขี้วัว, ไมซีเลียมของเชื้อ Streptomyces griseus และเนื้อ
กรดโฟลิค	Tetrahydrofolic acid	ไมซีเลียมของเชื้อรา Penicillium, spinach และตับ
ไบโอทิน	Biotin	กากน้ำตาลจากอ้อย, น้ำแช่ข้าวโพด และไมซีเลียมจากเชื้อรา Penicilium
พิวรินส์	Purine nucleotides	เนื้อและเลือดแห้ง
ไพรีมิดินส์	Pyrimidine nucleotides	เนื้อ
กรดลิโพอิค	Lipoic acid	ตับ
โคลีน	Phosphatides	ไข่แดงและดอกฮ็อปส์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.10 วัตถุดิบที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรทในอุตสาหกรรมการหมัก (วิชาพงษ์, 2525)

	(ก) แหล่งไนโตรเจน
แป้งถั่วเหลือง	ประมาณ 8 % ไนโตรเจนโดยน้ำหนัก
แป้งถั่วลิสง	
น้ำแช่ข้าวโพด	ประมาณ 4.5 % ไนโตรเจนโดยน้ำหนัก
หางนมผง	
แป้งข้าวโอ๊ต	
แป้งข้าวไรน์	ประมาณ 1.5-2.1 % ไนโตรเจนโดยน้ำหนัก
ข้าวบาร์เลย์	
กากน้ำตาล	
	(ข) แหล่งคาร์โบไฮเดรท
(1) แป้ง	แป้งข้าวโอ๊ต
	แป้งข้าวไรน์
	ข้าวบาร์เลย์
	แป้งถั่วเหลือง
	แป้งถั่วลิสง
(2) น้ำตาลทราย	น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์
	น้ำตาลดิบ
	กากน้ำตาลจากอ้อยและหัวบีท
(3) กลูโคส	กลูโคสโมโนไฮเดรทบริสุทธิ์
	แป้งที่ถูกย่อยสลายเป็นกลูโคส
(4) แลคโตส	แลคโตสบริสุทธิ์
	หางนมผง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 กระบวนการหมักด้วยระบบต่อเนื่อง

ในกระบวนการหมักแบบ batch process จุลินทรีย์ที่ใช้จะมีการเจริญผ่านช่วงระยะของ lag phase ไปสู่ exponential phase จนกระทั่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในน้ำหมัก เช่น การเปลี่ยนแปลงของ pH ความเข้มข้นของสารอาหาร และปริมาณสารอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น จะมีผลทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์หยุดชงักลง นั่นคือ เข้าสู่ stationary phase และ decline phase ในที่สุดเมื่ออัตราการตายของจุลินทรีย์มีค่าสูงกว่าอัตราการเจริญ เราเรียกช่วงลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ว่า วัฐจักรของการเจริญ (growth cycle) ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน จุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญ การใช้สารอาหาร การผลิตผลิตภัณฑ์ตลอดจนอัตราความต้องการออกซิเจนที่แตกต่างกันไป แต่ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง หลังจากที่จุลินทรีย์เจริญขึ้นถึงระดับหนึ่ง ซึ่งปกติเป็นจุดที่มีอัตราการเจริญและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุด เราจะจัดให้ปัจจัยสำคัญบางอย่างในน้ำหมัก เช่น ความเข้มข้นของเซล และความเข้มข้นของสารอาหารหลักอยู่ในระดับคงที่ที่เหมาะสม ทั้งนี้สามารถทำได้โดยการป้อนสารอาหาร (sterile food medium) เข้าสู่ถังหมัก พร้อมกับการปล่อยน้ำหมักออกจากถังหมักในอัตราเดียวกัน โดยที่มีการกวนน้ำหมักอย่างดี และอัตราการไหลผ่านของน้ำหมักจะต้องพอเหมาะที่จะทำให้อัตราการเพิ่มของเซลเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์เท่ากับอัตราการไหลออกของเซล อัตราการเพิ่มสารอาหารเข้าสู่ถังหมักเท่ากับอัตราการใช้สารอาหาร โดยจุลินทรีย์ในน้ำหมักและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับอัตราการไหลออกของผลิตภัณฑ์ในน้ำหมัก

กระบวนการหมักด้วยระบบต่อเนื่อง มีข้อดีหลายอย่าง เช่น

(1) เหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาด้านสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะแวดล้อมคงที่ชนิดหนึ่งชนิดใด
(2) ตามทฤษฎีแล้วให้ผลผลิตและประสิทธิภาพ ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงกว่าในระบบการหมักแบบ batch process และ semi-continuous process
(3) ประหยัดเนื้อที่ในการติดตั้งเครื่องมือและแรงงาน
(4) สามารถจัดระบบการควบคุมแบบอัตโนมัติได้

ดังนั้น นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจแก่การหมักด้วยระบบต่อเนื่องเป็นพิเศษ

ข้อเสียเปรียบของกระบวนการหมักระบบต่อเนื่อง (ไพบูลย์, 2520)

(1) ต้องการควบคุมทางชีววิทยาและเครื่องมืออย่างละเอียด
(2) อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ภายหลังการใช้นานๆ
(3) ต้องการควบคุมให้น้ำหมักอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดระยะเวลาการหมักนานๆ
(4) ขาดข้อมูลโดยละเอียด เกี่ยวกับพฤติกรรมตอบสนองของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมแบบต่างๆ

ตัวอย่างชนิดจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่มีการศึกษากันในระบบต่อเนื่อง ดังตารางที่ 2.11 และ 2.12

ตารางที่ 2.11 ตัวอย่างของชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักด้วยระบบต่อเนื่อง (Aiba, 1968)

ชนิดของจุลินทรีย์	สกุล
Actinomycetes	Streptomyces
Algae	Chlorella
	Euglena
	Scenedesmus
Bacteria	Acetobacter
	Aerobacter
	Bacillus
	Brucella
	Clostridium
	Salmonella
Fungi	Ophiostoma
	Penicillium
Protozoa	Tetrahymena
Yeast	Saccharomyces
	Torula

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.12 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารเคมีที่ผลิตได้โดยการหมักด้วยระบบต่อเนื่อง (Aiba, 1968)

ผลิตภัณฑ์ที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญ	ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริ
Acetic acid	Acetone
Ethanol	Glycogen
Bertanedial	Butanol
Gluconic acid	Subtilin
Hydrogen sulfide	Chloramphenicol
Lactic acid	Penicillin
	Streptomycin
	Vitamin B_{12}

2.6 ทฤษฎีของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

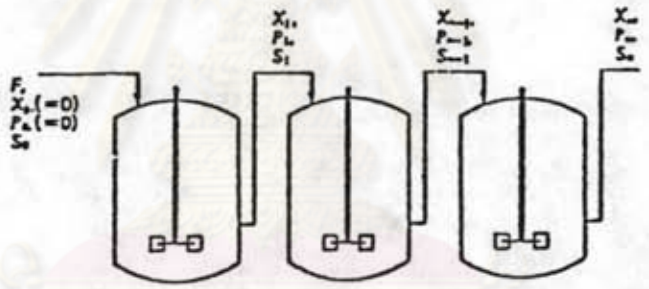
สมการของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ที่ใช้ถังหมักตั้งแต่สองถังขึ้นไป (multivessel continuous fermentation systems)

การจัดระบบการหมักแบบต่อเนื่องที่ใช้ถังหมักตั้งแต่ 2 ถังขึ้นไป มาต่อเนื่องเข้าด้วยกัน มีสาเหตุจูงใจที่สำคัญหลายประการที่สำคัญ ๆ ได้แก่

1) ในการใช้ single-stage system เนื่องจากความสามารถในการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์มีขีดจำกัด ดังนั้นหากใช้ dilution rate (D) ที่สูง ๆ สารอาหารหลักในน้ำหมัก จะมีเหลืออยู่ในความเข้มข้นที่สูง นับเป็นการสิ้นเปลืองมาก และถ้าต้องการให้การใช้สารอาหารโดยจุลินทรีย์ ในน้ำหมักเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพก็จำเป็นต้องใช้ dilution rate ที่ต่ำ ๆ อันเป็นผลให้ได้อัตราการผลิตต่อ 1 หน่วย เวลาที่ต่ำด้วย แต่ใน multi-vessel system นี้ เราสามารถใช้ dilution rate ที่สูง สารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมักก็จะถูกใช้ไปในถังหมักถัด ๆ ไป

2) กระบวนการหมักหลายชนิดมีความต้องการสภาวะควบคุมที่เหมาะสำหรับการเจริญของเซล และการสร้างผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันไป การใช้ถังหมักตั้งแต่สองถังขึ้นไปต่อเนื่องกันโดยปรับสภาวะควบคุมให้เหมาะสมตามความต้องการของแต่ละขั้นตอน ในการหมักย่อมทำให้ได้ประสิทธิภาพที่สูงกว่าการใช้ถังหมักเพียงถังเดียว ตัวอย่างเช่น ในการผลิตเพนนิซิลิน เราพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของช่วงแรกของการหมักหรือการเจริญของรา ก็คือ pH 4.7 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่สภาวะควบคุมที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน คือ pH 7.3 และอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นต้น

ใน multi-vessel system นี้โดยทั่วไปแล้ว จะใช้ถังหมักที่มีขนาดความจุเท่ากันต่อเนื่องกัน แบบอนุกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.3, F เป็นอัตราการไหลของน้ำหมักผ่านเข้าสู่ถังหมักแต่ละใบ V เป็นปริมาตรของน้ำหมักในถังหมักแต่ละใบ X_i, P_i และ S_i เป็นความเข้มข้นของเซล, สารผลิตภัณฑ์ และสารอาหารหลักในถังหมักใบที่ i ตามลำดับ



รูปที่ 2.3 แผนภูมิแสดงการหมักด้วยระบบต่อเนื่องที่ใช้จำนวนถังหมัก n ถังโดยที่สารอาหารปลอดเชื้อที่ไหลเข้าสู่ถังหมักถังที่ 1 มีความเข้มข้นของเซล สารผลิตภัณฑ์และสารอาหารหลักเป็น $X_0(=0)$, $P_0(=0)$ และ S_0 ตามลำดับ

ภายใต้สภาวะสมดุล เราจะได้ความเข้มข้นของเซลในถังหมักที่สองเป็น

$$X_2 = X_1F/(F-\mu_2V_2) \quad \text{.....(2.1)}$$

สำหรับในถังหมักที่สาม

$$X_3 = X_2F/(F-\mu_3V_3) \quad \text{.....(2.2)}$$

และสำหรับความเข้มข้นของเซลในถังหมักที่ n

$$X_n = X_{n-1}.F/(F-\mu_nV_n) \quad \text{.....(2.3)}$$

จากสมการที่ 2.1, 2.2 และ 2.3 และเนื่องจาก

$$V_1 = V_2 = \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots = V_n = V$$

$$\therefore\ X_n = \frac{X_1 F^{n-1}}{(F-\mu_2 V)\ (F-\mu_3 V)\ \ldots\ (F-\mu_n V)} \qquad \ldots\ldots\ldots(2.4)$$

หรือ

$$X_n = \frac{X_1 D^{n-1}}{(D-\mu_2)\ (D-\mu_3)\ \ldots\ (D-\mu_n)} \qquad \ldots\ldots\ldots(2.5)$$

ในที่นี้ F/V = dilution rate, D และ $D = 1/\theta$ โดยที่

θ = nominal holding time of flowing medium = V/F, hr.

ที่สภาวะสมดุล $\mu = D$

$$\therefore\ \text{จะได้}\ Xn = \frac{S_1 (1/\theta)^{n-1}}{(\mu_1-\mu_2)\ (\mu_1-\mu_3)\ \ldots\ (\mu_1-\mu_n)} \qquad \ldots\ldots\ldots(2.6)$$

สามารถกล่าวโดยทั่วไปได้ว่า ความเข้มข้นของเซลในถังหมักถังที่ n ขึ้นอยู่กับค่าความเข้มข้นของเซลในถังหมักถังแรก, D หรือ holding time (θ) และ specific growth rate ในแต่ละครั้ง

สมดุล ของปัจจัยต่าง ๆ ในถังหมักอาจแสดงโดยทั่วไปได้เป็น

การเปลี่ยนแปลง การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปัจจัยนั้น ๆ

= Input-outflow+

ปัจจัยในถังหมัก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์

ในแง่ของ X :

$$V\ \frac{dX_n}{dt} = F.X_{n-1} - F.X_n + V\left(\frac{dX_n}{dt}\right)_{\text{Growth in } n^{th} \text{ vessel}} \qquad \ldots\ldots\ldots(2.7)$$

$$\frac{dX_n}{dt} = D(X_{n-1}-X_n)+\mu_n X_n \qquad \ldots\ldots\ldots(2.8)$$

ในทำนองเดียวกันในแง่ของ P:

$$dP_n/dt = D(P_{n-1}-P_n)+Y_{p/x}\mu_n X_n \qquad \ldots\ldots\ldots(2.9)$$

สำหรับ S :

$$\frac{dS_n}{dt} = D(S_{n-1}-S_n) - \frac{1}{Y_{x/s}}\mu_n X_n \qquad \text{.....(2.10)}$$

ที่สภาวะสมดุล ค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่าง ๆ ด้านซ้ายมือของสมการตั้งแต่สมการที่ 2.7 ถึง 2.10 จะมีค่าเป็นศูนย์ ดังนั้นจากสมการที่ 2.8 จะได้

$$X_n = \frac{D.X_{n-1}}{D-\mu_n} \quad \text{เมื่อ } n \neq 1 \qquad \text{.....(2.11)}$$

สามารถใช้ประโยชน์จากสมการที่ 2.5 และ 2.11 นี้ ได้เป็นอย่างดี สำหรับการหาค่าความเข้มข้นของเซลในถังหมักถังที่ n (X_n) หรือในทางกลับกัน ก็คือ การใช้หาค่าของ μ_n ที่สภาวะสมดุลได้ เมื่อทราบความเข้มข้นของเซล

ในกรณีของถังหมักใบที่ 1 (n=1) ค่าของ X_{n-1} ก็คือ X_o มีค่าเป็นศูนย์ เมื่อแทนค่าลงในสมการที่ 2.8 จะได้ว่า

$$\mu_1 = D = \mu_{max} \cdot \frac{S_1}{K_s + S_1} \qquad \text{.....(2.12)}$$

μ_{max} = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารไม่มีขอบเขตจำกัด

K_s = ค่าคงที่ (saturated constant) มิลลิกรัมต่อลิตร

เนื่องจากค่า $S_1/(K_s + S_1) < 1$ ดังนั้น ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในเครื่องหมักตัวที่ 1 จะมีค่าน้อยกว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในทางทฤษฎีเสมอ ($D<\mu_{max}$) ซึ่งไม่เป็นความจริงในกรณีเมื่อเครื่องหมักผสมกันไม่สมบูรณ์ หรือ เมื่อมีอิทธิพลของความเข้มข้นมาเกี่ยวข้อง หรือเมื่อมีระบบการไหลหมุนเวียน (Recycling) แต่กรณีที่สนใจในการพิจารณา คือ เมื่อมีระบบการไหลหมุนเวียนของเชื้อจุลินทรีย์

ให้ r = อัตราส่วนของมวลสารที่หมุนเวียน (Fraction of the mass recycled)

ดังนั้น $dX_1/dt = D_1(rX_1-X_1)+\mu_1 X_1 \qquad \text{.....(2.13)}$

ในสถานะภาพคงที่ (steady state)

$$D_1 = \mu_1 \frac{1}{(1-r)}$$

$$= \mu_{max} \frac{S_1}{(K_s+S_1)(1-r)} \qquad \text{.....(2.14)}$$

จะเห็นได้ว่าสภาวะนี้เป็นไปได้ที่มีค่า $D_1 > \mu_{max}$ เมื่อมีระบบการไหลหมุนเวียนของเชื้อจุลินทรีย์มาเกี่ยวข้อง

สำหรับ P

$$P_n = \frac{DP_{n-1} + Y_{p/x}\mu_n X_n}{D} \qquad \text{.....(2.15)}$$

กรณีเครื่องหมัก 1 ตัว

$$P_1 = \frac{Y_{p/x}\mu_1 X_1}{D}$$

$$= Y_{p/x} X_1 \qquad \text{.....(2.16)}$$

สำหรับ S เมื่อสถานะภาพคงที่ (steady state)

$$S_n = S_{n-1} - \frac{Y_{p/x} X \mu_n}{DY_{p/s}} \qquad \text{.....(2.17)}$$

$$= S_{n-1} - \frac{\mu_n X_n}{DY_{x/s}} \qquad \text{.....(2.18)}$$

กรณีเครื่องหมัก 1 ตัว

$$S_1 = S_o - \frac{Y_{p/x}\mu_1 X_1}{DY_{p/s}} \qquad \text{.....(2.19)}$$

$$= S_o - \frac{Y_{p/x} X_1}{Y_{p/s}}$$

$$S_1 = S_o - \frac{X_1}{Y_{x/s}} \qquad \text{.....(2.20)}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 การเปรียบเทียบความสามารถของการหมัก

การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตระหว่างการหมักไม่ต่อเนื่อง กับการหมักแบบต่อเนื่อง (batch productivity compared to continuous productivity)

ค่าความสามารถในการผลิต (productivity) จะแสดงในรูปของจำนวนกรัมของผลิตภัณฑ์ต่อลิตรต่อชั่วโมง (Aiba, 1965) ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง 1 รอบ ใช้เวลาทั้งหมดดังนี้ คือ

$$t_c = t_m + t_o + t_1 + t_2 \qquad \text{.....(2.21)}$$

$$= t_m + t_n$$

$$= \frac{1}{\mu_{max}} \ln(X_m/X_1) + t_n \qquad \text{.....(2.22)}$$

t_m = เวลาที่ใช้ในช่วง exponential phase

t_o = harvest period

t_1 = เวลาที่ใช้ในการเตรียมระหว่างที่จะทำการหมักต่อไป

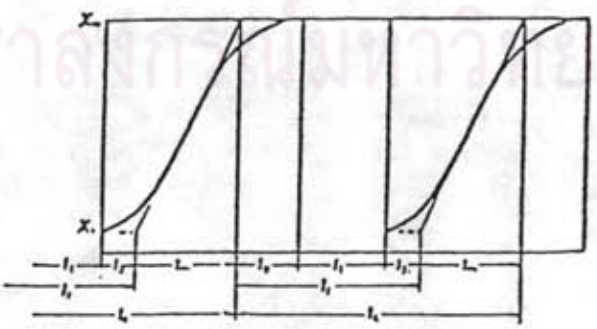
t_2 = เวลาที่ใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม

t_n = $t_o + t_1 + t_2$

X_1 = น้ำหนักเซลเริ่มแรก (initial cell concentration)

X_m = น้ำหนักเซลสูงสุด (maximum cell concentration)

μ_{max} = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด เมื่อความเข้มข้นของสารไม่มีขอบเขตจำกัด



รูปที่ 2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลกับเวลาที่ใช้ในการหมักไม่ต่อเนื่อง (Aiba, 1968)

จากสมการของปริมาณการเจริญเติบโต (yield of growth)

$$Y_{x/s} = -\Delta X/\Delta S \qquad \text{.....(2.23)}$$

$$Y_{x/s} S_o = X_m - X_1 \qquad \text{.....(2.24)}$$

ฉะนั้นอัตราการเกิดเซลในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (τ_{batch}), มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง คือ

$$\tau_{batch} = \frac{Y_{x/s} S_o}{1/\mu_{max} \ln(X_m/X_1)+t_s} \qquad \text{.....(2.25)}$$

ส่วนอัตราการเกิดเซลในการหมักแบบต่อเนื่อง (τ_{cont}), มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง คือ

$$\tau_{cont} = DX \qquad \text{.....(2.26)}$$

หรือ $(\tau_{cont})_{max} = D_m X_m \qquad \text{.....(2.27)}$

โดย $D_m = \mu_{max}\{1- K_s/(K_s+S_o)\} \qquad \text{.....(2.28)}$

$X_m = Y_{x/s}\{S_o+K_s- K_s(S_o+K_s)\} \qquad \text{.....(2.29)}$

เมื่อ D_m = อัตราการเจือจางสูงสุด (maximum dilution rate), ชั่วโมง$^{-1}$

S_o = ความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น (substrate concentration)

ฉะนั้น

$$(\tau_{cont})_{max} = \{\mu_{max}(1- K_s/(K_s+S_o))\} Y_{x/s}\{S_o+K_s-(K_s(S_o+K_s))\}$$

$$= Y_{x/s}\mu_{max} S_o \{((K_s+S_o)/S_o)- K_s/S_o\}^2 \qquad \text{....(2.30)}$$

เมื่อให้ $K_s << S_o$ จะได้

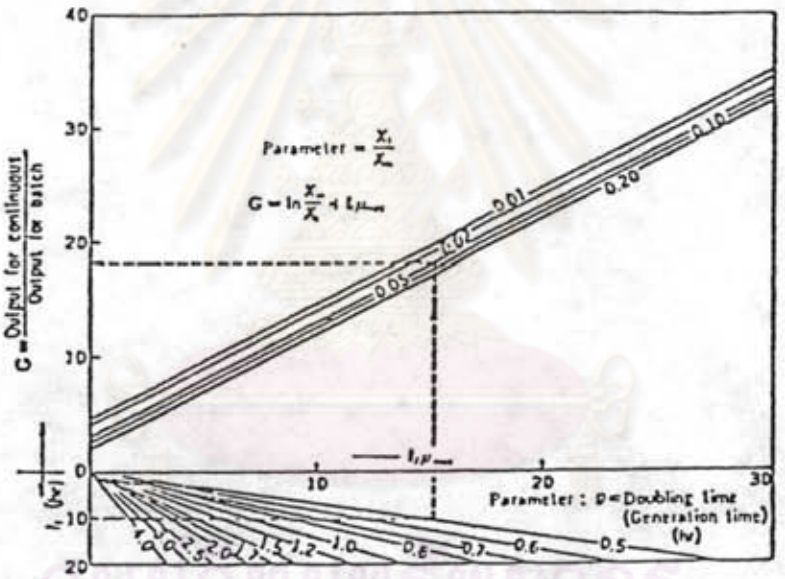
$$(\tau_{cont})_{max} = Y_{x/s}\mu_{max} S_o \qquad \text{.....(2.31)}$$

กำหนดให้ $G = \frac{(\tau_{cont})_{max}}{\tau_{batch}} \qquad \text{.....(2.32)}$

$$= \frac{Y_{x/s}\mu_{max}S_o}{Y_{x/s}S_o/\{(1/\mu_{max})\ln(X_m/X_1)+t_s\}}$$

$$\frac{(\tau_{cont})_{max}}{\tau_{batch}} = \ln\frac{X_m}{X_1}+t_s\mu_{max} \qquad \text{.....(2.33)}$$

จากสมการ 2.33 สามารถแสดงในกราฟรูปที่ 2.5 โดยให้ปริมาณเซลที่เติมลงไป (Inoculum size) 5 % X_1/X_m = 0.05, t_e = 10 ชั่วโมง doubling time (t_d) = 0.05 ชั่วโมง ซึ่งถ้าเปลี่ยนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องไปเป็นการหมักแบบต่อเนื่อง ค่า G จะมีค่าเท่ากับ 18 นั่นคือค่า G จะได้รับอิทธิพลจากค่า t_d, t_e มากกว่าค่า X_1/X_m มาก แสดงให้เห็นว่า ปรากฏการณ์การหมักแบบต่อเนื่องจะให้ประโยชน์ สำหรับเซลที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว (รูปที่ 2.5 นี้จะแสดงในรูปของการผลิตเซล ซึ่งสามารถนำมาใช้กับการเกิดผลิตภัณฑ์เช่นกัน)



รูปที่ 2.5 การเปรียบเทียบการหมักไม่ต่อเนื่อง กับการหมักแบบต่อเนื่อง (Aiba, 1968)

ในทำนองเดียวกันเมื่อแทนค่าพารามิเตอร์ X_1/X_m = 0.05, te = 10 ชั่วโมง ลงในสมการที่ 2.33 สามารถหาค่าของความสามารถในการผลัดระหว่างการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักต่อเนื่อง ที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่าง ๆ กัน (Wang, 1979) ดังแสดงในตารางที่ 2.13

ตารางที่ 2.13 การเปรียบเทียบผลผลิตในการหมักไม่ต่อเนื่อง กับการหมักแบบต่อเนื่อง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในการหมักไม่ต่อเนื่อง (μ_{max}, ชั่วโมง$^{-1}$)	ผลผลิตของการหมักแบบต่อเนื่อง (G) / ผลผลิตของการหมักไม่ต่อเนื่อง
0.05	3.5
0.10	4.0
0.20	5.0
0.40	7.0
0.80	11.0
1.0	13.0
1.2	15.0

จากตารางนี้พอสรุปได้ว่า การหมักแบบต่อเนื่อง จะให้ผลผลิตดีกว่าการหมักไม่ต่อเนื่อง และจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตที่เร็วกว่า จะเหมาะกับการหมักแบบต่อเนื่องมากยิ่งขึ้น

2.8 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตระหว่างการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักกึ่งต่อเนื่อง (batch productivity compared to semicontinuous productivity)

อัตราการเกิดเซลในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (r_{semi}) มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนเมตรต่อชั่วโมง คือ

$$r_{semi} = \frac{1}{2}\left\{Y_{x/s}\mu_{max}S_o + \frac{Y_{x/s}S_o\mu_{max}}{\ln(X_m/X_1)+t_s\mu_{max}}\right\} \quad \text{.....(2.34)}$$

$$= \frac{1}{2}Y_{x/s}\mu_{max}S_o\left\{\frac{\ln(X_m/X_1)+t_s\mu_{max}+1}{\ln(X_m/X_1)+t_s\mu_{max}}\right\} \quad \text{.....(2.35)}$$

กำหนด $$Q = \frac{r_{semi}}{r_{batch}} \quad \text{.....(2.36)}$$

$$= \frac{1}{2}\left\{\frac{\ln X_m}{X_1} + t_s\mu_{max}+1\right\} \quad \text{.....(2.37)}$$

เมื่อแทนพารามิเตอร์ $\%X_s/X_m = 0.05$ $t_d = 10$ ชั่วโมง ลงในสมการ (2.37) สามารถหาค่าอัตราส่วนของความสามารถในการผลิตระหว่างการหมักไม่ต่อเนื่อง กับการหมักกึ่งต่อเนื่อง ที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่าง ๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 2.14

ตารางที่ 2.14 การเปรียบเทียบผลผลิตในการหมักไม่ต่อเนื่องกับการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในการหมักไม่ต่อเป็นครั้งคราว (μ_{max}, ชั่วโมง$^{-1}$)	ผลผลิตของการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (G) / ผลผลิตของการหมักไม่ต่อเนื่อง
0.05	2.2
0.10	2.5
0.20	3.0
0.40	4.0
0.80	6.0
1.0	7.0
1.2	8.0

จากตาราง 2.14 จะเห็นว่าการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจะให้ผลดีกว่าการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและเมื่อเทียบกับตารางที่ 2.13 จะพบว่าการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจะให้ผลอยู่ระหว่างการหมักแบบต่อเนื่องกับการหมักไม่ต่อเนื่อง

2.9 การจัดจำแนกระบบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

ระบบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง อาจจำแนกได้หลายแบบ ถ้าใช้ลักษณะธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยา และชีวเคมี ในกระบวนการหมักชนิดนั้น ๆ เป็นพื้นฐาน ก็แบ่งกระบวนการหมักได้เป็น 2 ลักษณะ (Wang, 1979) คือ เป็นการหมักเพื่อ

1. ผลิตเซลของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ต้องการ
2. ผลิตสารเคมีบางอย่าง ซึ่งอาจจะเกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นโดยจุลินทรีย์ หรืออาจได้จากการย่อยสลายสารอาหารในน้ำหมักไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

ในแง่ของวิศวกรรมเคมี อาจจำแนกได้เป็น 2 ระบบ (Herbert, 1961) คือ

1. Homogeneous system ระบบนี้จัดได้ว่ามีส่วนประกอบต่าง ๆ ในน้ำหมักกระจายอย่างสม่ำเสมอ จุลินทรีย์มีลักษณะทางสรีรวิทยาเท่าเทียมกันโดยตลอด ในขณะที่การหมักอยู่ในสภาวะสมดุล (ตัวอย่างเช่น การหมักด้วยเครื่องหมักระบบแอร์ลิฟท์)

2. Heterogeneous system ในระบบนี้ถึงแม้ว่าจะอยู่ในสภาวะสมดุล ความเข้มข้นของเซล ความเข้มข้นของสารอาหาร และผลิตภัณฑ์ในแต่ละจุดจะแตกต่างกัน และจุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ตามตำแหน่งต่าง ๆ ในระบบก็มีความแตกต่างกันทั้งทางด้านสรีรวิทยา และความสามารถในการเจริญเติบโต หรือการผลิตผลิตภัณฑ์ ซึ่งความแตกต่างกันนี้คล้าย ๆ กับว่าอยู่ในช่วงต่าง ๆ ของวงจรชีวิต

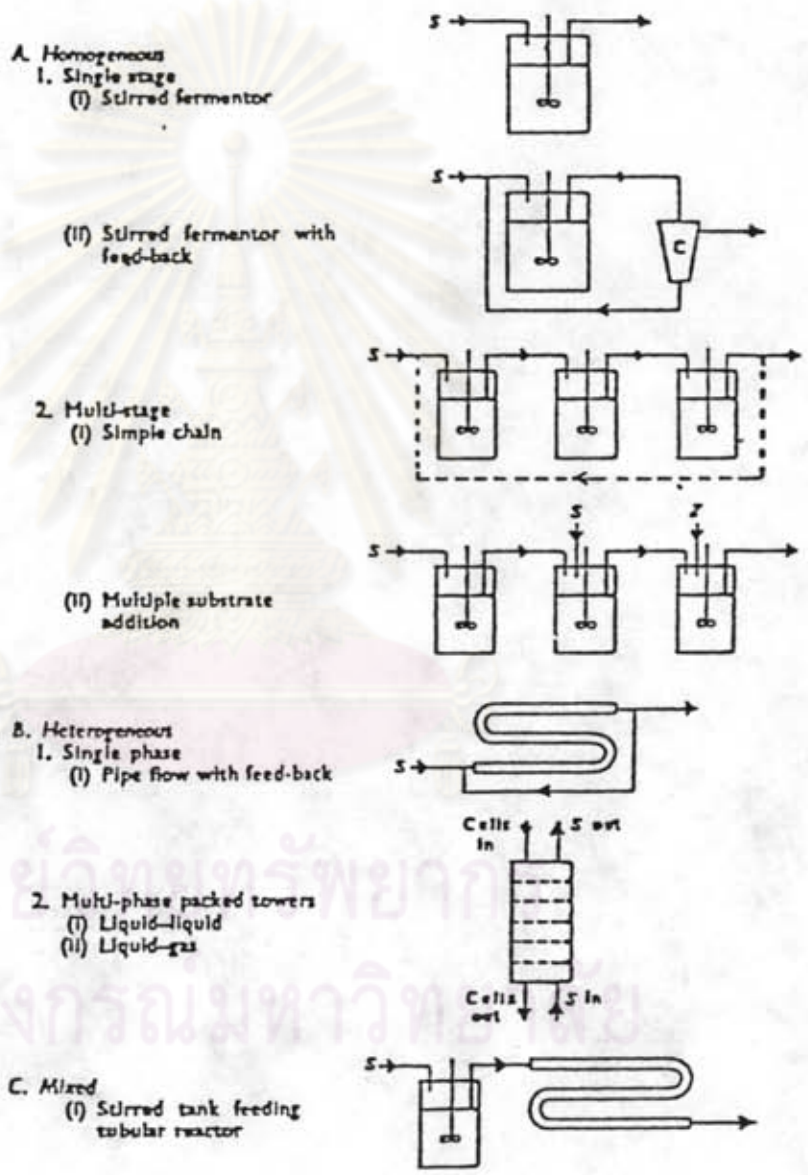
นอกจากนี้ Herbert, D. (1961) ได้จำแนกระบบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเป็น 2 ระบบใหญ่ ๆ คือ ระบบเปิด (open system) และระบบปิด (closed system) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 และ 2.7

1. ระบบเปิด หมายถึงระบบที่จุลินทรีย์ในน้ำหมักจะไหลออกมาพร้อมกับผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา

2. ระบบปิด จุลินทรีย์จะถูกกักให้อยู่ภายในเครื่องหมัก ทั้งนี้อาจจะใช้วิธีกรองไม่ให้จุลินทรีย์ผ่านออกมากับผลิตภัณฑ์ หรือทำให้จุลินทรีย์กลับเข้าสู่ถังหมักตลอดเวลา

I17495283

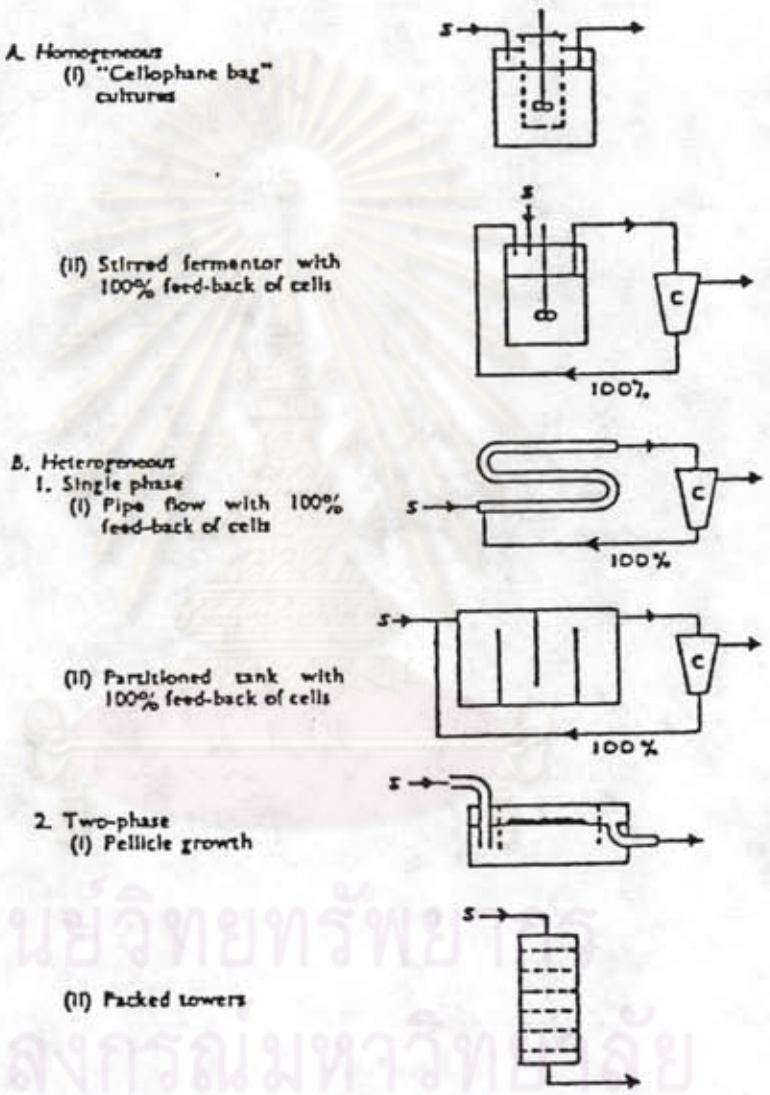
ซึ่งกระบวนการหมักทั้ง 2 ระบบนี้ สามารถแบ่งย่อยออกไปเป็นระบบ homogeneous ระบบ heterogeneous และระบบผสม ซึ่งในแต่ละระบบจัดให้เป็นแบบ Single stage หรือ multi-stage ก็ได้



รูปที่ 2.6 การจัดจำแนกกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในระบบเปิด (ไพบูลย์, 2520)

S, Z = การไหลเข้าของสารอาหาร

C = เครื่องเหวี่ยงแบบต่อเนื่อง หรือถังตกตะกอน



รูปที่ 2.7 การจัดจำแนกกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในระบบปิด (ไพบูลย์,2520)

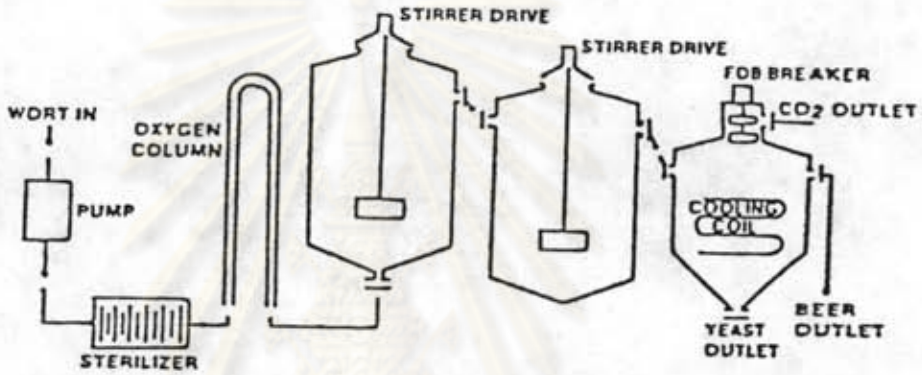
S = การไหลเข้าของสารอาหาร

C = เครื่องเหวี่ยงแบบต่อเนื่อง หรือถังตกตะกอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.10 <u>ชนิดของเครื่องหมักในระบบต่อเนื่อง</u> (Lyons, 1981)

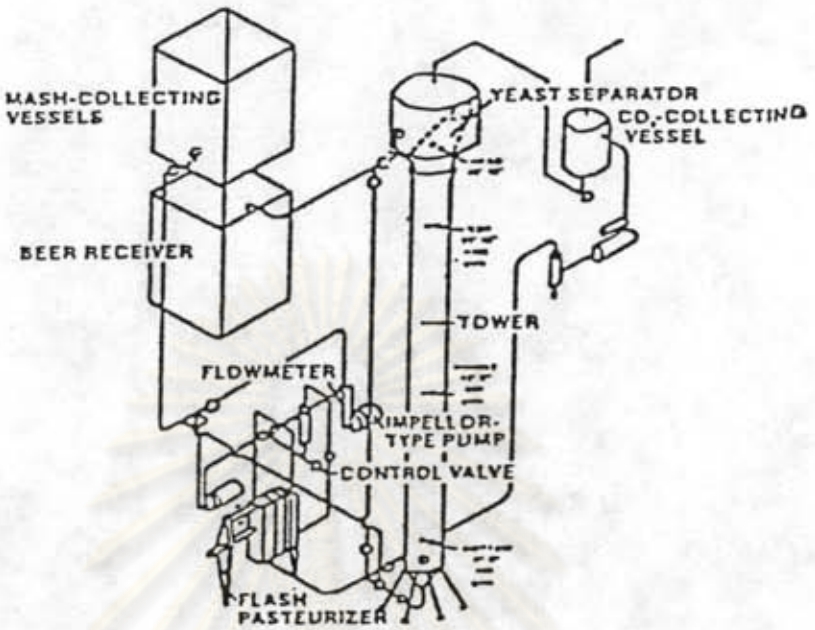
1. เครื่องหมักระบบชั้นบันได หรือระบบไหลล้น (Cascade system or over-flow continuous fermentation system) ระบบนี้สารอาหารจะไหลเข้าสู่ถังหมักแรก จนถึงระดับที่จะเกิดการไหลล้น น้ำหมักก็จะไหลไปยังถังหมักถัดไป รูปแบบของระบบดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 เครื่องหมักระบบชั้นบันได หรือระบบไหลล้น (Hough, 1971)

2. เครื่องหมักระบบหอสูง (Continuous tower fermentor system)

มีลักษณะโดยทั่วไป เป็นทรงกระบอกตั้งในแนวดิ่ง จุลินทรีย์ที่ใช้หมักจะแขวนลอยอยู่ในน้ำหมัก อากาศและน้ำหมักมีทิศทางการไหลไปทางเดียวกัน ทำให้เกิดการผสมผสานกันของน้ำหมักอย่างสม่ำเสมอ ลักษณะการทำงานของเครื่องหมักระบบหอสูง ก็โดยให้อากาศที่ผ่านการกรองหรือฆ่าเชื้อแล้ว ผ่านหัวกระจายอากาศ ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นเจาะรูพรุน หรือเป็นทรงกลมติดอยู่บริเวณฐานของเครื่องหมัก เกิดเป็นกลุ่มของฟองอากาศลอยตัวขึ้นไป ขณะเดียวกันมีการละลายของออกซิเจนจากฟองอากาศลงสู่น้ำหมัก ลักษณะเช่นนี้ เป็นการกวนให้น้ำหมัก อากาศ และเซลจุลินทรีย์ มีโอกาสผสมผสานกันได้โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องกวนเหมือนเครื่องหมักแบบถังกวน (Imrie and Greenshields, 1973) รูปแบบเครื่องหมักระบบหอสูง ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 เครื่องหมักระบบหอสูง (Imrie and Greenshield, 1973)

2.11 <u>การนำเซลยีสต์กลับมาใช้งานใหม่</u>

เมื่อการทดลองดำเนินไปถึงระยะหนึ่ง ยีสต์ที่ไหลไปกับน้ำหมักผ่านคอลัมน์ต่าง ๆ จนกระทั่งคอลัมน์หลัง ๆ กิจกรรมของยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลจะลดลง และเซลเริ่มจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เมื่อปริมาณเอทานอลสูงมากขึ้นถึงร้อยละ 11-12 จะมีผลต่อเซลของยีสต์ ทำให้สร้างเอทานอลออกมาจากเซลน้อยลง ประกอบกับอาหารในน้ำหมักมีไม่เพียงพอ ทำให้ยีสต์ในช่วงหลัง inactive ดังนั้น จึงมีวิธีการนำยีสต์ที่ติดไปกับผลิตภัณฑ์มากระตุ้นได้ active ใหม่ ซึ่งทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. ล้างด้วยกรด โดยการนำตะกอนยีสต์ (Yeast slurry) ใส่ในกรดทาร์ทาริก กรดฟอสฟอริก หรือกรดซัลฟูริก เพื่อปรับ pH ให้มีประมาณ 2-3 เป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ทิ้งไว้ 2-8 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใส่ในคอลัมน์แรก

แต่วิธีนี้มีข้อเสีย เนื่องจาก pH ต่ำมาก อาจทำให้การทำงานของยีสต์เปลี่ยนแปลงไปในระยะเริ่มทำการหมักใหม่ ๆ โดยยีสต์เหล่านี้จะผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซัลไฟด์ ได้ (Harrison, 1970)

2. ให้อากาศ ในปริมาณเพียงเล็กน้อยตลอดเวลา คือ ประมาณ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (0.04-0.06 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) ก็จะช่วยกระตุ้นการทำงานของยีสต์ได้โดยไม่มีผลกระทบต่อเอทานอลในระบบ (Lyons, 1981) ในการผลิตเบียร์ พบว่าภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ อัตราการผลิตเบียร์จะต่ำ (Ricketts & Hough, 1961)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย