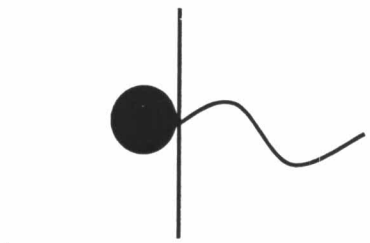
บทที่ 2
ทฤษฎี

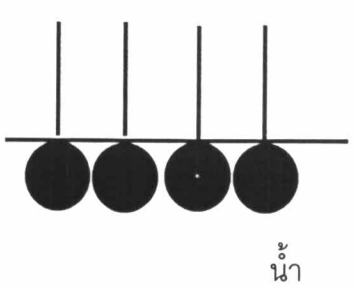
การศึกษา การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ได้ในปริมาณที่มากเพียงพอสำหรับการนำไปใช้งานและเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาระบบการหมักต่อไปในอนาคต ต้องทราบถึงลักษณะโดยทั่วไปของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว ชนิด และโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิด การรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย กลไกการนำอาหารเข้าสู่เซลล์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสุดท้ายเนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้วิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจึงจำเป็นต้องศึกษา วิธีการดำเนินการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องด้วย

2.1 ลักษณะโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) คือ สารลดแรงตึงผิวที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่ได้มาจากจุลินทรีย์ทั้ง แบคทีเรีย รา ยีสต์ คุณสมบัติที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิว คือช่วยในการลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาค สองวัฏภาค โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว จะสะสมตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัส ของทั้งสองวัฏภาค เช่น ผิวสัมผัสระหว่างของเหลวด้วยกัน ของเหลวกับแก๊ส หรือระหว่างของแข็งกับของเหลว โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว มีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิฟาติก (amphipatic structure) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (ส่วนที่ชอบน้ำ) ส่วนใหญ่เป็นส่วนหัวของโมเลกุล ได้แก่สารจำพวก โปรตีน และน้ำตาลซึ่งจะเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟต เป็นต้น และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) หรือ ส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) ส่วนใหญ่เป็นส่วนหางของโมเลกุล ซึ่งจะเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมัน ทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีทั้งโมเลกุลใหญ่และโมเลกุลเล็ก ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป ดังรูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตัวอย่างของ การกระจายตัวของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวได้แก่ การกระจายตัวอยู่ระหว่างผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับอากาศ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะหันส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุเข้าหาโมเลกุลของน้ำ ในขณะที่ส่วนไม่มีขั้วจะหันไปทางอากาศ การกระจายตัวของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบนผิวของน้ำ ดังแสดงในรูป ที่ 2.2

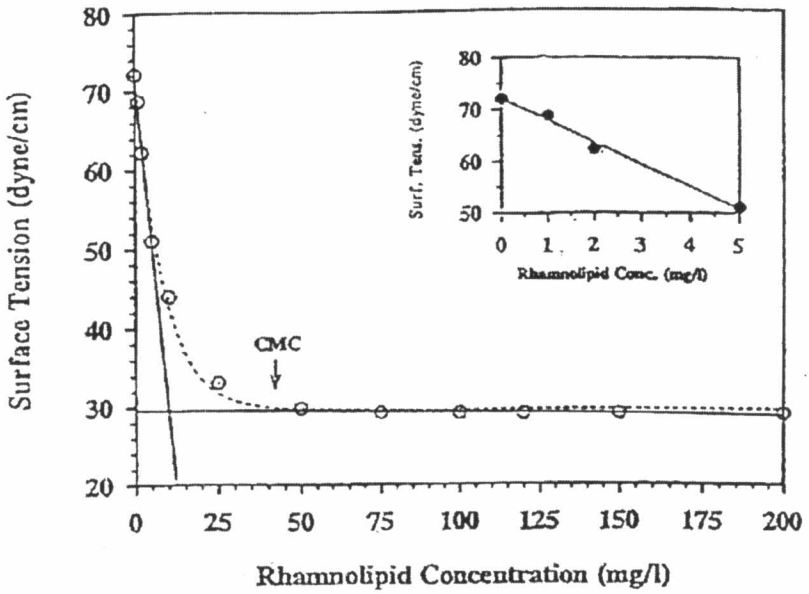


รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว



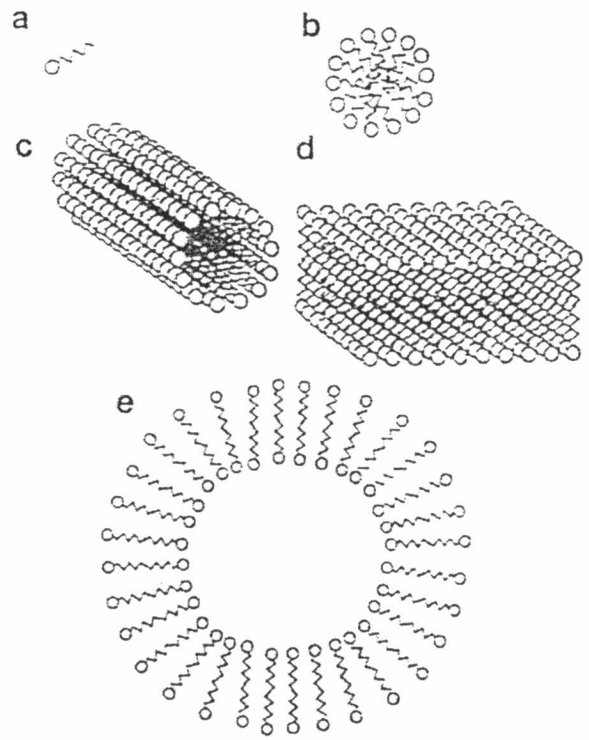
รูปที่ 2.2 การกระจายตัวของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวบนผิวน้ำ

เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายอยู่ในตัวทำละลายเช่น น้ำ สารลดแรงตึงผิวจะมีบทบาทในการลดแรงตึงผิวของน้ำกับอากาศ โดยดูได้จากค่าแรงตึงผิวที่ลดลงนั่นคือเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นค่าแรงตึงผิวจะลดลงเรื่อยๆ จนถึงระดับหนึ่งและมีค่าคงที่ การลดลงของแรงตึงผิวนี้เกิดเนื่องจากการสะสมตัวของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวที่เพิ่มมากขึ้นบริเวณผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาค จนในที่สุดบริเวณนั้นอิ่มตัวไปด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทำให้ถึงแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเข้าไปในระบบมากกว่านี้ก็ยังทำให้แรงตึงระหว่างผิวมีค่าคงที่ค่าหนึ่ง ส่วนโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินที่ไม่สามารถแทรกตัวระหว่างผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคได้ก็จะรวมตัวกันเป็นไมเซลล์ (micelle) ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยและสารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกันจะให้ค่าของความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ซึ่งทำให้เกิดการรวมตัวของไมเซลล์ เรียกว่าความเข้มข้นวิกฤติของไมเซลล์ (CMC,critical micelle concentration) ซึ่งขั้นตอนการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ทำได้โดยการเตรียมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่างๆกันและทำการวัดค่าแรงตึงผิวที่ลดลง เขียนกราฟความสัมพันธ์ที่จุดเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงค่าแรงตึงผิวเป็นเป็นค่าของความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวกับค่าแรงตึงผิวเพื่อแสดงการหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (Zhang และ Miller,1992)

ค่า CMC ยังสามารถบอกได้ว่าพร้อมที่จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เช่น ไมเซลล์ (micelle) ไบเลเยอร์ (bilayer) และ เวสสิเคิล (vesicles) ดังรูปที่ 2.4 ซึ่งการรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดจากแรงไฮโดรฟอบิก (hydrophobic) แวนเดอร์วาวล์ (van der Waal's) อิเล็กโทรสแตติก (electrostatic) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Fiechter, 1992)

a. โครงสร้างโมโนเมอร์ (monomer) ของแอมฟิฟาติกโมโลกุล
b. โครงสร้างไมเซลล์แบบกลม
c. โครงสร้างไมเซลล์แบบแท่ง
d. โครงสร้างไมเซลล์แบบเลเยอร์
e. โครงสร้างไมเซลล์แบบเวสสิเคิล

การเกิดการรวมตัวกันของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นโครงสร้างต่างๆ จะขึ้นอยู่กับความสมดุลของส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophyllic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของโมเลกุลของสารและแรงดึงดูดหรือแรงผลักของส่วนที่ไม่ชอบน้ำและชอบน้ำของโมเลกุลนั้น

มิติของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่างๆเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดว่าโครงสร้างของการรวมตัวของโมเลกุลในสารละลายจะเป็นรูปแบบใด โดยมิติของโมเลกุลจะสามารถอธิบายได้โดยค่าที่เรียกว่า พารามิเตอร์ของการรวมตัววิกฤต (Critical packing parameter,CCP) ซึ่งค่าของ CCP หาได้จากสมการต่อไปนี้ (Mayers,1980)

$$CPP = \frac{V}{a_0 l_c}$$

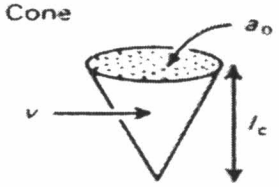
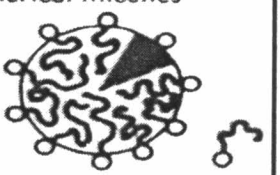
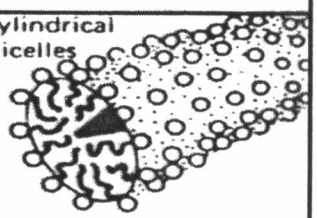
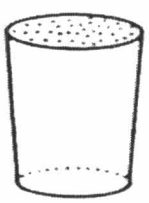
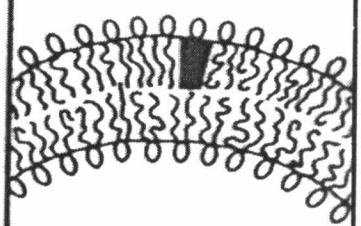
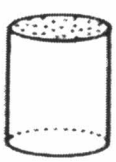
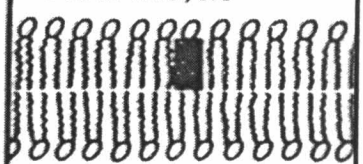
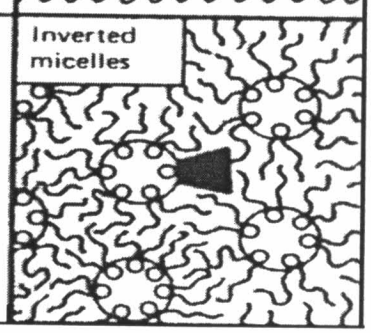
เมื่อ v คือ ปริมาตรของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

a_0 คือ พื้นที่หน้าตัดของส่วนที่มีขั้วของโมเลกุล

l_c คือความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนในโมเลกุล

ค่าของ CCP ที่คำนวณได้สามารถประเมินได้ดังนี้

- ค่า CCP น้อยกว่า 0.33 จะให้ไมเซลล์แบบกลม
- ค่า CCP อยู่ระหว่าง 0.33 และ 0.5 จะให้ไมเซลล์แบบแท่ง
- ค่า CCP อยู่ระหว่าง 0.5 และ 1.0 จะให้ไมเซลล์ผนังสองชั้นแนวโค้ง
- ค่า CCP ประมาณ 1.0 จะให้ผนังสองชั้นแบบเลเยอร์
- ค่า CCP มีค่ามากกว่า 1.0 จะได้ไมเซลล์กลับด้าน

ลักษณะสารลดแรงตึงผิว	Critical packing shape	Structures formed
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สายเดี่ยว ส่วนชอบน้ำมีขนาดใหญ่	Cone 	Spherical micelles 
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สายเดี่ยว ส่วนชอบน้ำมีขนาดเล็ก	Truncated cone	Cylindrical micelles 
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สองสาย ส่วนชอบน้ำมีขนาดใหญ่	Truncated cone 	Flexible bilayers, vesicles 
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สองสาย พวก anionic มีเกลือมาก และ saturated ส่วนชอบน้ำมีขนาดเล็ก	Cylinder 	Planar bilayers 
ส่วนไม่ชอบน้ำเป็นโซ่สองสาย พวก anionic และ saturated ส่วนชอบน้ำมีขนาดเล็ก	Inverted truncated cone or wedge	Inverted micelles 

รูปที่ 2.5 การรวมตัวของโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Cilint, 1992)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนมากจะมีประจุสุทธิเป็นกลางหรือเป็นลบ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นลบ อาจเนื่องมาจากหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ฟอสเฟต หรือ หมู่ซัลเฟต เป็นต้น ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุบวกนั้น อาจเกิดจากอิทธิพลของหมู่เอมีน แต่ก็พบได้น้อย (Cooper,1986) ค่าที่แสดงถึงประสิทธิ์ภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากค่า CMC ที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีอีกหลายค่าได้แก่

1. ค่าแรงตึงผิว (surface tension) หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวและอากาศ มีหน่วยเป็น มิลลินิวตันต่อเมตร(mN/m) หรือ ไดน์ต่อเซนติเมตร (dyne/cm) ซึ่งค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ 72 มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถือว่ามีประสิทธิ์ภาพดีจะทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 35 มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) (Kosaric, 1993)
2. ค่าแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาค (interfacial tension) หมายถึง แรงที่กระทำระหว่างของเหลวกับของเหลวที่มีวัฏภาคต่างกัน มีหน่วยเป็น มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) การวัดแรงตึงระหว่างผิวระหว่างวัฏภาคจะวัดระหว่างน้ำและ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน เฮกซาเด็กเคน (hexadecane) หรือ น้ำมันก๊าด (kesosene) โดยทั่วไปค่าแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคของน้ำกับเฮกซาเด็กเคนมีค่าเท่ากับ 50 มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) ส่วนค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมันก๊าดมีค่าเท่ากับ 30-40 มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) ซึ่งเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปสามารถลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคลงเหลือ 0.1-1.0 มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) (Gerson, 1993)
3. การเกิดอิมัลชั่น (Emulsification) คือความสามารถในการทำให้น้ำและ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมันปิโตรเลียม สารละลายอินทรีย์ และน้ำมันพืชชนิดต่างๆ รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดอิมัลชั่นระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นผลทำให้น้ำมันมีสภาพเป็นหยดเล็กๆ อยู่ในน้ำ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำและ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน การวัดประสิทธิ์ภาพในการเกิดอิมัลชั่น อาจทำด้วยการวัดค่าอิมัลชั่น อินเด็กซ์ คือการวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของชั้นอิมัลชั่นและ ความสูงของชั้นของเหลวในหลอดทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และอาจวัดความเสถียรของอิมัลชั่นที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าอิมัลชั่น อินเด็กซ์ในระยะเวลาที่นานออกไป

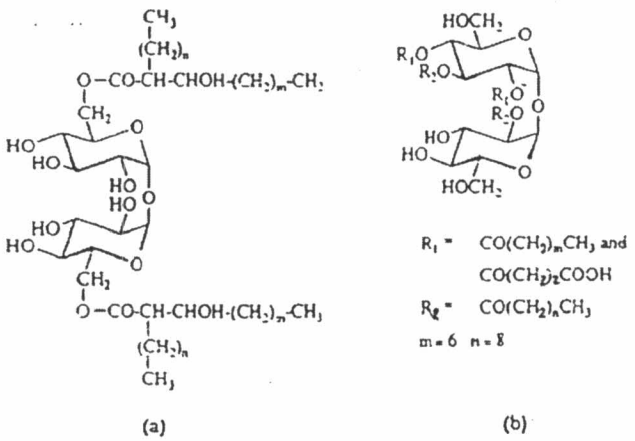
2.2 การจำแนกสารสดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำโดยอาศัยองค์ประกอบของโครงสร้างภายในที่แตกต่างกัน กล่าวคือส่วนของโมเลกุลไม่มีขั้วเป็นสายยาวของกลุ่มไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมัน (fatty acid) และองค์ประกอบของโมเลกุลที่มีขั้ว เช่น กลุ่มเอสเทอร์ (ester)กลุ่มแอลกอฮอล์ (alcohol group) กลุ่มคาร์บอกซิเลท (carboxylate group) กลุ่มฟอสเฟต (phosphate containing group) กลุ่มคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ดังนั้นสามารถจำแนกประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกเป็น 5 ประเภทดังนี้

2.2.1 ไกลโคลิปิด(glycolipid)

เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นส่วนของโมเลกุลที่มีขั้ว เช่น กลูโคส แมนโนส กาแล็คโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส และ กาแล็คโตสซัลเฟต เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น กรดอะลิฟาติก(aliphatic acid) และ ไฮดรอกซีอะลิฟาติก (hydroxy-aliphatic) โดยอาจเชื่อมต่อกับคาร์บอไฮเดรต 1-2 โมเลกุล สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จัดเป็นไกลโคลิปิดได้แก่ ทรีฮาโลส (trehalose) โซโฟโรลิปิด (sophorolipids) แรมโนลิปิด(rhamnolipid) เตตระเอซิลกลูโคส tetraacylglucose) ไตรเอซิลกลูโคส (triacylglucose) แมนโนซิลเออริททอล ลิปิด (mannosylerythritol lipid) ซูโคส ลิปิด (sucrose lipid) ฟรุกโทส ลิปิด(fructose lipid) ไดเอซิล อิโนสิทอล แมนโนไซด์(diacyl inositol mannoside) เป็นต้น

2.2.1.1 ทรีฮาโลสลิปิด มีโครงสร้างหลายแบบแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีรายงานถึงการผลิตทรีฮาโลสลิปิด ได้แก่ *Mycobacterium, Rhodococcus ,Antrobacter* และ *Cyanobacterium* ซึ่งลักษณะของทรีฮาโลส มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.6



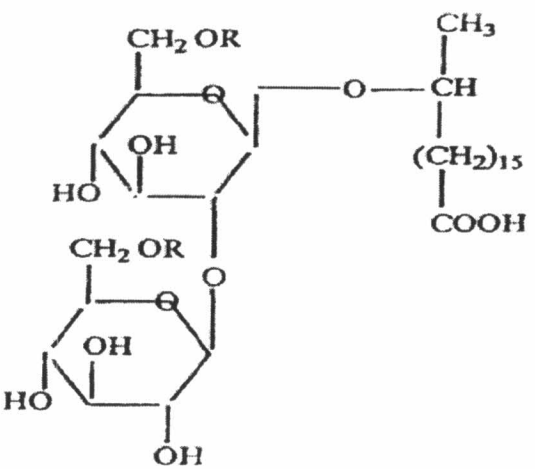
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของทรีฮาโลสลิปิด (Kosaric ,1993)

(a) ทรีฮาโลลลิปิด 6,6' ไดโครีโนมัยโคเลท

(Trehalose 6,6' dicorynomycolate)

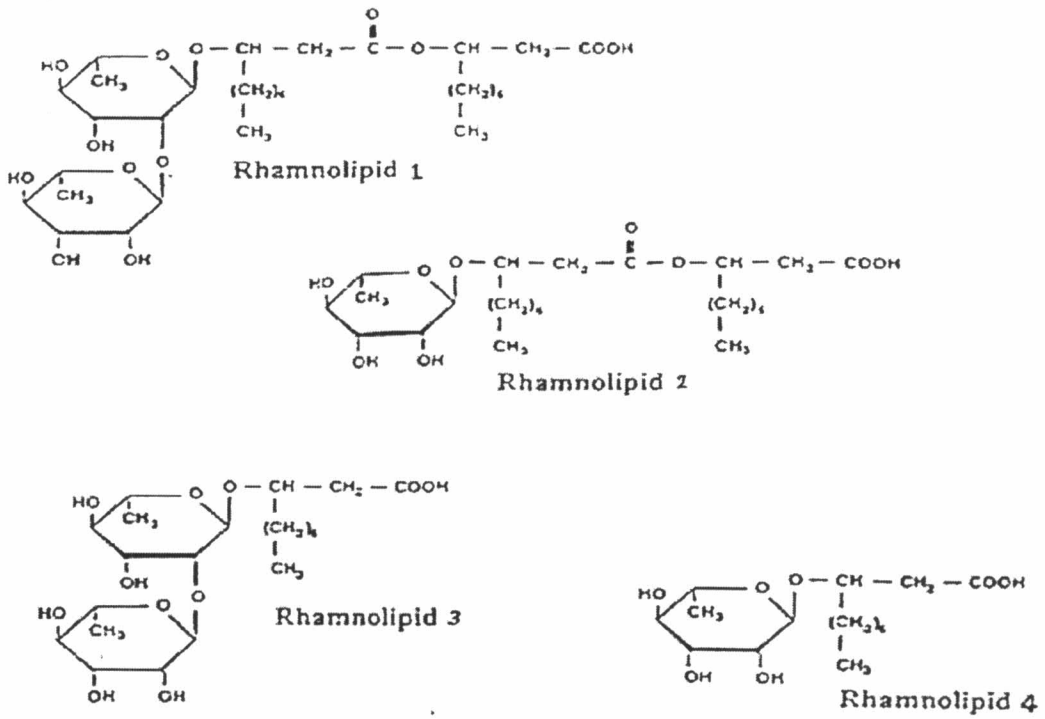
(b) ทรีฮาโลส เททราเอสเทอร์ (Trehalose tetraester)

2.2.1.2 <u>โซโฟโรลิปิด</u> โครงสร้างของโซโฟโรลิปิด ประกอบไปด้วยส่วนของ ไดเมอร์ริก คาร์โบไฮเดรต โซโฟโรส (dimeric carbohydrate sophorose) เชื่อมต่อกับโมเลกุลของกรดไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิก (hydroxyl- carboxylic acid) (Davila และคณะ ,1992) ลักษณะโครงสร้างจะเป็นดังรูปที่ 2.7 จุลินทรีย์ที่มีรายงานถึงการผลิตโซโฟโรลิปิดจะเป็นพวกยีสต์ ซึ่งจะผลิตสารออกมาภายนอกเซลล์



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของโซโฟโรลิปิด (Cameotra และ Makkar ,1998)

2.2.1.3 <u>แรมโนลิปิด</u> เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Pseudomonas* โครงสร้างของแรมโนลิปิดแบ่งออกเป็น 4 แบบประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลแรมโนส เชื่อมต่อกับโมเลกุลของ กรดบีต้าไฮดรอกซิลเดคาโนอิก (β- hydroxyl decanoic acid) (Fiechter,1992)โครงสร้างของ แรมโนลิปิดจะเป็นดังรูปที่ 2.8

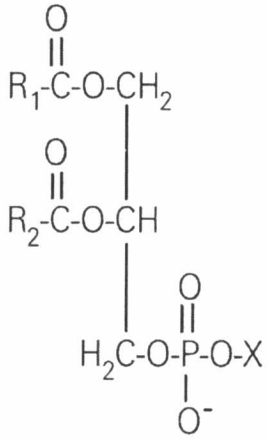


รูปที่ 2.8 โครงสร้างของแรมโนลิปิดทั้ง 4 ชนิด (Fiechter,1992)

2.2.2 <u>ฟอสโฟลิปิด และกรดไขมัน (Phospholipids and Fatty acids)</u>

โมเลกุลของฟอสโฟลิปิดประกอบไปด้วยกลีเซอรอลที่แทนที่ด้วยกรดไขมัน 2 ตัว ฟอสเฟต และแอลกอฮอล์ ซึ่งฟอสโฟลิปิดทุกตัวมีหัวที่มีขั้วหนึ่งตัวและไม่มีขั้ว หนึ่งตัว หางจะมีลักษณะเป็นแอมฟิพาธิก ซึ่งโครงสร้างของของฟอสฟอลิปิดแสดงดังรูปที่ 2.9

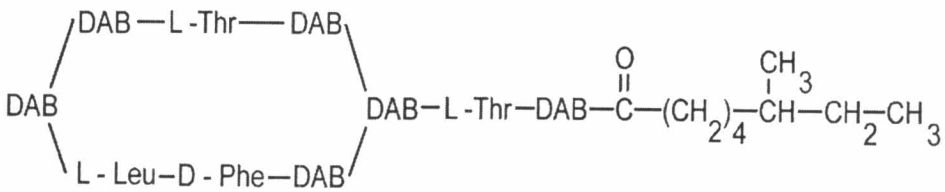
จุลินทรีย์ที่ผลิตฟอสโฟลิปิดได้แก่ *Candida spp. Micrococcus spp.* ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพวกนี้จะผลิตออกมาภายนอกเซลล์



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของฟอสโฟลิปิด(Cooper และ Zajic, 1980)

2.2.3 <u>เปบไทด์และกรดอะมิโน</u>

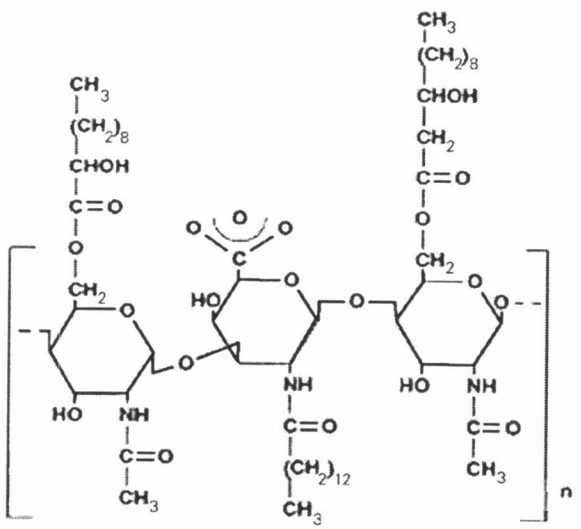
สารกลุ่มนี้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มักมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ เช่น เซอร์แฟคติน (surfactin) หรือซับทิไลซิน (subtilysin) พอลิมัยซิน(polymyxins) และไลเคไนซิน (lichenysin) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้ ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp (Rosenberg, 1986) และ *Pseudomonas* บางชนิด (Yamane, 1987) โครงสร้างของสารกลุ่มนี้ เป็นกลุ่มของกรดอะมิโนเชื่อมต่อกัน มีปลายข้างหนึ่งเชื่อมต่อกับกลุ่มคาร์บอกซิล และอีกข้างหนึ่งเชื่อมต่อกับหมู่ไฮดรอกซิล



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของเปบไทด์และกรอะมิโน(Suzuki และคณะ, 1965)

2.2.4 สารประเภทโพลิเมอร์

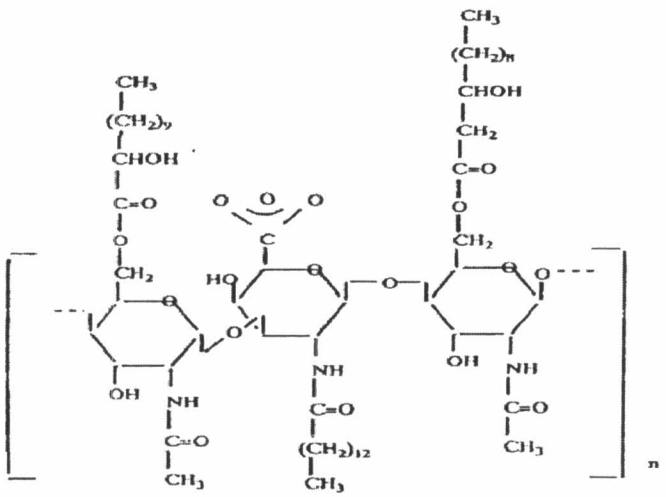
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น อิมัลแซน (emulsan) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพต่ำในการลดแรงตึงผิว แต่จะเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันได้ดี และมีเสถียรภาพมาก นอกจากนี้ยังมี ไลโปแซน (liposan)ซึ่ง ประกอบด้วยคาร์บอไฮเดรต 83% ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และกรดกาแลคโตยูโรนิค และโปรตีน 17% และสารประกอบโปรตีนของโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ ตัวอย่างโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทโพลิเมอร์เหล่านี้แสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11โครงสร้างของอิมัลแซน ที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* (Desai และ Banat, 1997)

2.2.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค

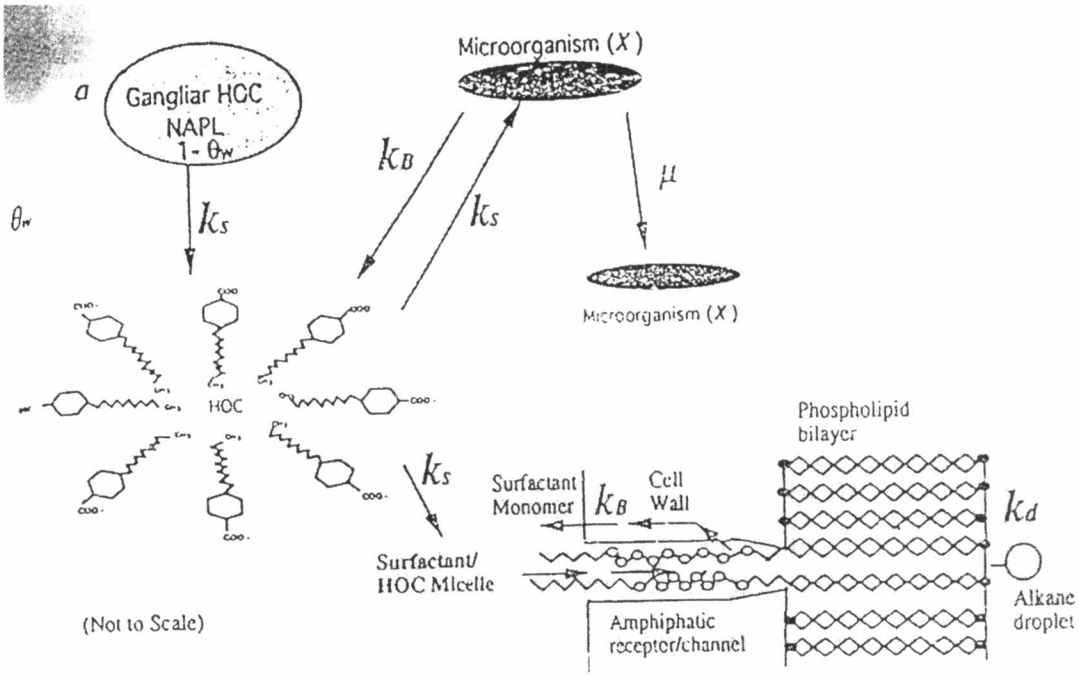
เป็นส่วนของ เอกซ์ตราเซลลูลาร์เมมแบรนเวสซิเคิล (extracellular membrane vesicles) มาฟอร์มเป็นไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ซึ่งมีส่วนช่วยในการนำสารอาหาร เข้าสู่เซลล์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวประเภทนี้จะสะสมตัวอยู่บนผิวของเซลล์จุลินทรีย์ องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชนิดอนุภาคจะประกอบไปด้วย โปรตีน ฟอสโฟลิปิด และไลโพโพลิแซคคาไรด์



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค
(Cameotra และ Makkar,1998)

2.3 กระบวนการขนย้ายอาหารเข้าเซลล์

เซลล์จะมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อทำให้สารอาหารประเภทไขมันหรือน้ำมันเกิดเป็นหยดอิมัลชั่น โดยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นจะหันส่วนที่ไม่มีขั้วหรือสายไฮโดรคาร์บอนล้อมรอบสารอาหารและหันส่วนที่มีขั้วเข้าสู่เซลล์ จากนั้นจะมีการเคลื่อนย้ายสารอาหารเข้าสู่เซลล์โดยเคลื่อนที่ผ่านผนังเซลล์และผ่านผนังแบบสองชั้นของ Phospholipid เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ของเซลล์ต่อไป (ดังแสดงในรูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.13 การขนถ่ายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์

(Sekcisky และ Shreve, 1999)

จากลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ดังกล่าวและรูปแบบการเกิดเป็นผนังสองชั้นของ Phospholipid นำมาใช้อธิบายกลไกการนำแหล่งอาหารคาร์บอนไปใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ การรวมตัวระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวภาพภายในสารละลายและกระบวนการขนถ่าย (tra nsport) ของไมเซลล์ไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์แสดงดังรูปที่ 2.5

กลไกการขนย้ายโมเลกุลสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ประกอบด้วย 3 กลไกซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

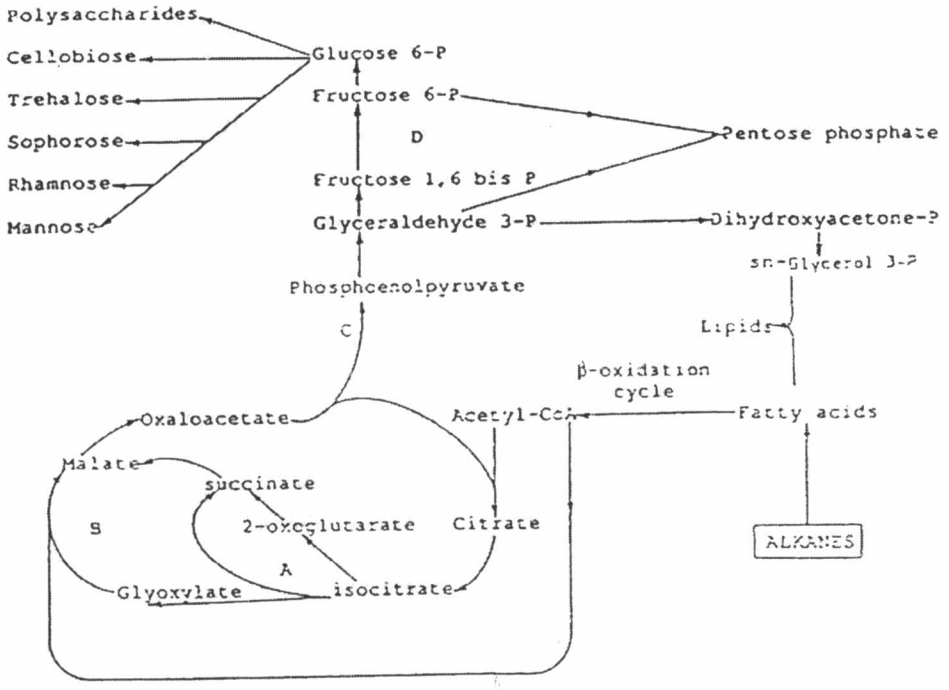
1. การขนย้ายและการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก
2. การนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมาใช้โดยการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างโมเลกุลของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับเซลล์ ซึ่งขนาดโมเลกุลสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของเซลล์
3. การขนย้ายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในรูปของไมเซลล์

ลักษณะการเป็นโมเลกุลไม่มีขั้วของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั่วไปจะไม่สามารถอธิบายด้วยกลไกแบบแรก เพราะการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำจะมีค่าน้อยจึงมีบทบาทต่อการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตน้อย ดังนั้นการนำแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปของ

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนไปใช้ภายในเซลล์สามารถอธิบายด้วยลักษณะกลไกแบบที่สอง และแบบที่สาม หรือทั้งสองรูปแบบผสมกัน ระบบที่ประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวเริ่มต้นที่ได้จากการเติมสารลดแรงตึงผิวเข้าไปในระบบหรือการผลิตขึ้นมาของจุลินทรีย์ มีความสำคัญอย่างมากต่อการละลาย และการกระจายตัวของโมเลกุลสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในการละลาย การอธิบายกลไกการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยกลไกแบบที่สอง เป็นลักษณะของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่กระจายตัวเป็นหยดน้ำมัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของจุลินทรีย์ การใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์เกิดจากการที่จุลินทรีย์เกาะรวมตัวกันล้อมรอบบนหยดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยตรงอาศัยสารลดแรงตึงผิวช่วยในการยึดเกาะ จึงเกิดการขนย้ายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ตัวแปรหลักของกลไกลักษณะนี้ขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างจุลินทรีย์ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ขณะที่กลไกแบบที่สามจะเป็นลักษณะการกระจายตัวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนรวมตัวกับโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวในรูปของไมเซลล์ที่สามารถขนย้ายผ่านช่องของผนังเซลล์ได้ ตัวแปรหลักของกลไกแบบที่สามจึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของส่วนที่เกิดขึ้นเป็นไมเซลล์ (micellar-phase hydrocarbon concentration) และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Sekcisky และ Shreve,1999; AL-Tahhan และคณะ,2000)

แหล่งอาหารคาร์บอนต่างชนิดกัน มีรูปแบบขั้นตอนการนำไปใช้ของจุลินทรีย์แตกต่างกัน กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ทั่วไป ในงานวิจัยของเลิศลักษณ์ (2547) ได้ใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งกลไกการขนย้ายนำแหล่งคาร์บอนในลักษณะของน้ำมันเข้าสู่ภายในเซลล์อาศัยรูปแบบกลไกที่สองหรือแบบที่สามที่ได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งขั้นตอนการนำเอาแหล่งอาหารคาร์บอนที่อยู่ในรูปของน้ำมันมาใช้ภายในเซลล์แสดงดังรูปที่ 2.6 ลักษณะของกลไกเป็นกระบวนการใช้อาหารประเภทอัลเคนหรือน้ำมันผ่านวัฏจักรเครป (Krebs cycle) ซึ่งจะให้กลูโคสออกมา โดยกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป

กลไกเริ่มจากสารอาหารประเภทอัลเคนหรือน้ำมันจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เกิดเป็นกรดไขมัน จากนั้นจะเข้าสู่ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (β-oxidation) เกิดเป็นอะซิทิล โคเอ (Acetyl CoA) แล้วผ่านเข้าสู่วัฏจักรเครป ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการนี้แล้วจะทำให้เซลล์มีการผลิตพลังงานสะสมให้อยู่ในรูปของ ATP และมีการผลิตเป็นสารต่าง ๆ ซึ่งสารตัวหนึ่งที่ได้จากกระบวนการนี้คือน้ำตาลแรมโนสและส่วนของสายไฮโดรคาร์บอน ซึ่งในที่สุดจะเกิดเป็นแรมโนลิปิดซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดหนึ่ง ซึ่งกระบวนการผลิตโมเลกุลสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้จะขึ้นกับภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้งาน จากกรณีของอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ถ้าจุลินทรีย์ต้องการนำแหล่งอาหารคาร์บอนซึ่งแยกชั้นจากชั้นของน้ำหมัก จุลินทรีย์จะมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อช่วยในการทำให้เกิดหยดอิมัลชั่นของน้ำมัน ทำให้จุลินทรีย์สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น ซึ่งจะมีผลดีต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์



รูปที่ 2.14 กลไกการนำสารประกอบอัลเคนผ่านกรดไขมันไปใช้ภายในเซลล์ (Kosaric, 1993)

2.4 ลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์

การผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นภายในถังหมัก มีลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์แตกต่างกันออกไปซึ่งแบ่งออกได้เป็น 4 รูปแบบดังนี้

2.4.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่ไปกับการเจริญเติบโต

(Growth associated biosurfactant production)

ลักษณะของการเกิดผลิตภัณฑ์ประเภทนี้จะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แสดงดังรูปที่ 2.15 (a) อัตราการเจริญของผลิตภัณฑ์ประเภทนี้จะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ดังสมการ (2.4.1-1)

$$r_p = \frac{dP}{dt} = \rho x \qquad (2.4.1\text{-}1)$$

เมื่อ r_p คือ อัตราการผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

P คือ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

X คือ ความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์

ρ คือ อัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะ

(specific production rate)

t คือ เวลา

และอัตราการเกิดสารลดแรงตึงผิวจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดของเซลล์ดังนี้

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x}\frac{dx}{dt} \qquad (2.4.1\text{-}2)$$

โดยกำหนดให้ $Y_{p/x}$ คือผลได้ของผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ (production yield) ซึ่งอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบบไม่ต่อเนื่องสามารถอธิบายได้ดังสมการที่ (2.4.1-3)

$$\frac{dx}{dt} = \mu x_0 \qquad (2.4.1\text{-}3)$$

เมื่อ μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate)

แทนสมการ (2.4.1-3) ลงใน (2.4.1-2) จะได้

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x}\mu x_0 \qquad (2.4.1\text{-}4)$$

ดังนั้นจะได้อัตราการเกิดสารลดแรงตึงผิวจำเพาะดังนี้

$$\rho = Y_{p/x}\mu \qquad (2.4.1\text{-}5)$$

2.4.2 <u>การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ</u>

(Biosurfactant production by growing cell under growth limiting condition)

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้จะเป็นการการผลิตภายใต้สภาวะเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดสารตั้งต้น ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งมักจะเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อสารตั้งต้นถูกจุลินทรีย์ใช้ไปในการเจริญเติบโตหมด การผลิตสารลดแรงตึงผิวก็จะเริ่มขึ้น

การเพิ่มขึ้นของสารลดแรงตึงผิวจะมีความสัมพันธ์ทั้งในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตและช่วงที่เซลล์หยุดการเจริญเติบโต ดังสมการ (2.4.2-1)

$$\begin{aligned}\frac{dP}{dt} &= Y_{p/x}\left(\frac{dx}{dt}\right) + m_p x_0 \\ &= Y_{p/x}\mu x_0 + m_p x_0 \\ &= \left(Y_{p/x}\mu + m_p\right)x_0 \end{aligned} \qquad (2.4.2\text{-}1)$$

ให้ m_p คืออัตราการเกิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงที่เกิดการหยุดการเจริญของเซลล์ และสามารถหาอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะได้ทั้งในช่วงของการเจริญเติบโตของเซลล์และช่วงที่เซลล์หยุดการเจริญเติบโตได้จาก

$$\rho = Y_{p/x}\mu + m_p \qquad (2.4.2\text{-}2)$$

ลักษณะของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเป็นไปดังรูปที่ 2.15 (b)

2.4.3 <u>การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักของเซลล์</u>

(Biosurfactant production by resting cell.)

เป็นภาวะของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เชื้อที่อยู่ในระยะพักเป็นหัวเชื้อ ในขณะที่เชื้อยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยการเจริญของเชื้อจะคงที่และรักษาระดับอยู่ตลอดเวลาในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของจุลินทรีย์โดยตรงซึ่งสามารถเขียนความสัมพันธ์ได้ดังสมการ

$$\frac{dP}{dt} = m_p x \qquad (2.4.3\text{-}1)$$

และสามารถหาอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำเพาะได้

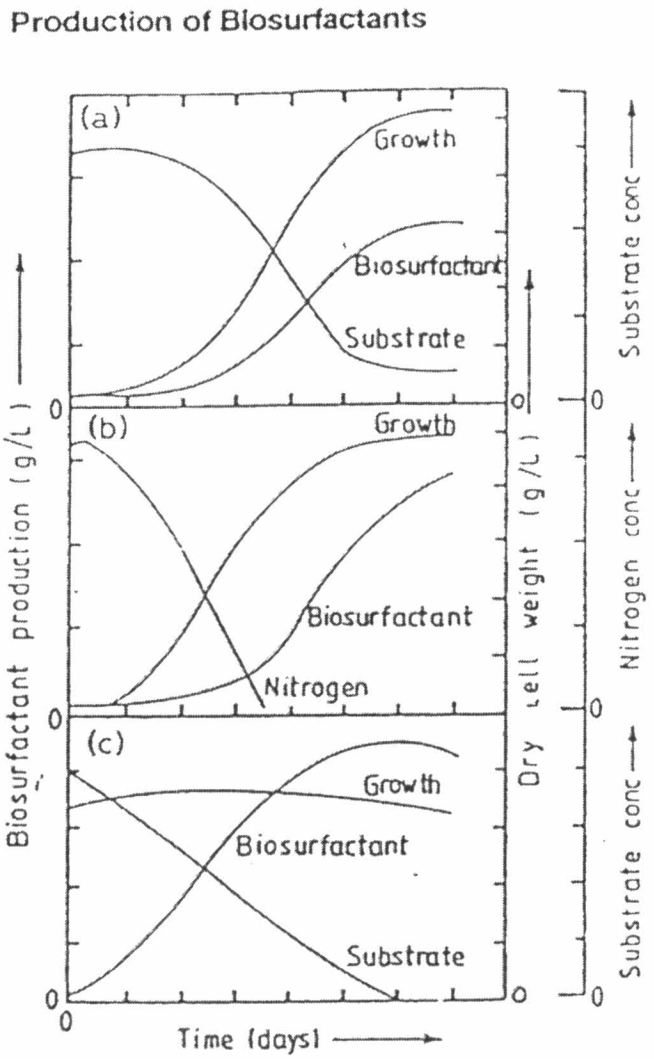
$$\rho = m_p \qquad (2.4.3\text{-}2)$$

ซึ่งจะพบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ จะไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งลักษณะของกราฟจะเป็นดังรูปที่ 2.15 (c)

2.4.4 <u>การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเติมสารเริ่มต้น</u>

(Biosurfactant production by addition of Precursors)

เป็นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีการเติมสารตั้งต้นลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิว ซึ่งทำให้ผลผลิตมีการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและคุณภาพ



รูปที่ 2.15 ลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ(Kosaric,1993)

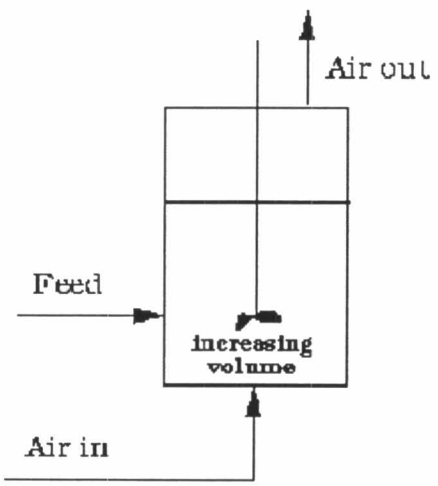
(a) การเกิดผลิตภัณฑ์ควบคู่ไปกับการเจริญเติบโต

(b) การเกิดผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดการเจริญเติบโต

(c) การเกิดผลิตภัณฑ์ในช่วงระยะพักของเซลล์

2.5 กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Fed batch Fermentation)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยอาศัยวิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เป็นกระบวนการที่มีการเติมอาหารเข้าไปอย่างต่อเนื่องเป็นระยะๆ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเพาะที่เลี้ยงจุลินทรีย์ออกเลย ดังนั้นปริมาตรของอาหารจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้มีจุดประสงค์เพื่อจะหลีกเลี่ยงภาวะยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นของอาหารมากเกินไป แต่การเติมสารอาหารด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบนี้สามารถที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักได้โดยจะให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นการขยายเวลาในการที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสับสเตรทให้ยาวนานขึ้น



รูปที่ 2.16 การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (www.gl.umbc.edu/~gferre1/ fermentor.gif)

ซึ่งสามารถทำสมดุลมวลได้ดังนี้

สมดุลเซลล์:

$$\frac{d\ (\ xV\ \ )}{dt} = \mu\, x\ \ V \qquad (2.5\text{-}1)$$

$$V\frac{dx}{dt} + x\frac{dV}{dt} = \mu x V \qquad (2.5\text{-}2)$$

เมื่อ $\frac{dV}{dt} = F$

$$V\frac{dx}{dt} + xF = \mu xV \qquad (2.5\text{-}3)$$

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{Fx}{V} + \mu x \qquad (2.5\text{-}4)$$

และกรณีของสับสเตรทจะได้สมการแสดงสมดุลดังนี้

สมดุลสับเสรท:

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_0 - \frac{\mu xV}{Y_{x/s}} \qquad (2.5\text{-}5)$$

จากสมการ

$$S\frac{dV}{dt} + V\frac{dS}{dt} = FS_0 - \frac{\mu xV}{Y_{x/s}} \qquad (2.5\text{-}6)$$

แต่ปริมาตรอาหารในถังหมักเพิ่มขึ้นตามเวลา

$$V = V_0 + Ft \qquad (2.5\text{-}7)$$

หาอนุพันธ์จากสมการ(2.5-7)

$$\frac{dV}{dt} = \frac{d}{dt}(V_0 + Ft) \qquad (2.5\text{-}8)$$

เมื่อ V_0และ F เป็นค่าคงที่จากสมการ(2.5-8)จะได้

$$\frac{dV}{dt} = F \qquad (2.5\text{-}9)$$

แทนในสมการ(2.5-6) จะได้

$$SF + V\frac{dS}{dt} = FS_0 - \frac{\mu x V}{Y_{x/s}} \qquad (2.5\text{-}10)$$

นำ V หารตลอดสมการ(2.5-10) จะได้

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}(S_f - S) - \frac{\mu x}{Y_{x/s}} \qquad (2.5\text{-}11)$$

เมื่อกำหนดให้

X_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

X = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาใดๆ

t = เวลา

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ(specific growth rate)

S_f = ความเข้มข้นของสับเสรทในสายป้อน

S = ความเข้มข้นของสับเสรทที่เหลือ

F = อัตราการป้อนสารตั้งต้น

$Y_{x/s}$ = ปริมาณเซลล์ต่อหน่วยสับเสรทที่ถูกใช้ไป

V = ปริมาตรของถังปฏิกรณ์

V_0 = ปริมาตรของสารตั้งต้นในถังปฏิกรณ์ตอนเริ่มต้น

เมื่อพิจารณาแล้วจะพบว่าในกรณีของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องนั้น ปริมาตรของน้ำหมักในถังจะไม่คงที่ จะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป ทำให้อัตราการเจือจาง ($\frac{F}{V} = D$)ไม่คงที่ แต่ก็สามารถเกิดสถานะคงตัวได้ที่เรียกว่า สถานะคงตัวชั่วคราว(quasi steady state) เมื่อค่า F มีค่าน้อยๆ

เพราะฉะนั้น

$$\frac{F}{V} = \mu \qquad (2.5\text{-}12)$$

ซึ่งในสถานะดังกล่าวค่าความเข้มข้นของเซลล์จะต้องคงที่ (X = const.) แต่จะแตกต่างจากกรณีของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องคือ $\frac{dS}{dt}$ จะไม่เท่ากับ 0 และในขณะที่ความเข้มข้นของสับสเตรทลดลงเรื่อยๆนั้น ค่าของ $\frac{F}{V}=\mu$ ก็จะลดลงด้วยเช่นเดียวกัน

เมื่ออาศัยสมการของ Monod มาอธิบายสถานะคงตัวชั่วคราว(quasi steady state) ดังกล่าวจะได้ว่า

$$\frac{F}{V}=\mu=\mu_{max}\frac{S}{K_s+S} \qquad (2.5\text{-}13)$$

ซึ่งจะได้ว่า

$$S=\frac{F}{V}\left[\frac{K_s}{\mu_{\max}-\frac{F}{V}}\right] \qquad (2.5\text{-}14)$$

2.5.1 <u>วิธีป้อนสารอาหารในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง</u>

1. <u>กรณีไม่มีการควบคุมแบบย้อนกลับ</u>(With out feedback control)

ประกอบไปด้วยวิธีต่างๆดังนี้

1.1 การป้อนด้วยอัตราการป้อนคงที่ (Constant feeding) เป็นวิธีการป้อนสารอาหารที่อัตราการป้อนคงที่ ซึ่งจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลงอย่างต่อเนื่อง

1.2 การป้อนด้วยอัตราการป้อนเพิ่มขึ้น (Increased feeding) เป็นวิธีการป้อนสารอาหารโดยการเพิ่มอัตราการป้อนขึ้นเรื่อยๆ โดยอาจจะเพิ่มขึ้นทีละน้อย หรือเพิ่มโดยให้มีลักษณะเป็นขั้นๆ หรืออาจจะเพิ่มอัตราการป้อนเป็นเส้นตรง วิธีนี้สามารถทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องถ้าอัตราการป้อนของอาหารเพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์

1.3 การป้อนด้วยอัตราการป้อนที่เพิ่มขึ้นทวีคูณ (Exponential feeding) เป็นการป้อนสารอาหารโดยให้อัตราการป้อนเพิ่มขึ้นเป็นเอกซ์โปแนนเชียล วิธีนี้จะทำให้ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะคงที่ ส่วนใหญ่แล้วมักจะควบคุมให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอยู่ในระดับคงที่ซึ่งจะทำได้นั้นต้องใช้วิธีการป้อนสารอาหารเป็นแบบเอกซ์โปแนนเชียลแต่วิธีนี้จะเกิดการเบี่ยงเบนได้ง่ายในระหว่างการทดลองเมื่อเกิดสิ่งผิดปกติขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก

2. กรณีมีการควบคุมแบบย้อนกลับ (With feedback control)

แบ่งออกได้เป็น 2 วิธีคือ

2.1 การควบคุมแบบย้อนกลับโดยวิธีทางอ้อม(Indirect feedback control)

- DO-stat วิธีนี้จะป้อนสารอาหารเข้าสู่ถังหมักเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อปริมาณสับสเตรทเหลือน้อยลง
- PH-stat เป็นวิธีการป้อนอาหารเมื่อค่า pH เปลี่ยนแปลงไปซึ่งเกิดเนื่องจากปริมาณแหล่งคาร์บอนลดลง นั่นคือเมื่อแหล่งคาร์บอนถูกใช้จนหมด ค่าพีเอชก็จะสูงขึ้นเนื่องมาจากความเข้มข้นของแอมโมเนียมไอออนที่เซลล์ขับออกมามีมากขึ้น
- Carbon dioxide evolution rate(CER) วิธีนี้ทำการวัดโดยต่อเข้ากับแมสสเปคโตรมิเตอร์(Mass spectrometer) และใช้ควบคุมการป้อนของอาหารซึ่ง CER เป็นสัดส่วนกับอัตราการย่อยสลายแหล่งคาร์บอน ซึ่งเซลล์จะผลิต ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาในระหว่างการเจริญเติบโต
- Cell concentration ป้อนอาหารโดยอาศัยวิธีการวัดความเข้มข้นของเซลล์ หรืออาจวัดโดยใช้ Turbidimeter

2.2 การควบคุมแบบย้อนกลับโดยวิธีตรง (Direct feedback control) มีการเติมสารอาหารโดยวัดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ เช่น กลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ