บทที่ 1

บทนำ

1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม อาทิเช่น อุตสาหกรรมที่มีผลิตภัณฑ์ในรูปของเซลล์ยีสต์ ได้แก่ ยีสต์ขนมปัง และอาหารเสริมของคนและสัตว์ อุตสาหกรรมที่มีผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ ไวตามินบี ไวตามินดี เอนไซม์บางชนิดสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร และสารชีวเคมีซึ่งใช้ในการทำงานวิจัยและอุตสาหกรรมที่ได้จากกระบวนการหมัก ได้แก่ เอธานอล (ethanol) กรดซิตริก (citric acid) และกลีเซอรอล (glycerol) เป็นต้น (Brock and Madigan, 1991) โดยเฉพาะยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการทำยีสต์ขนมปัง การผลิตเอธานอล และการผลิตสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งมีลักษณะดังนี้

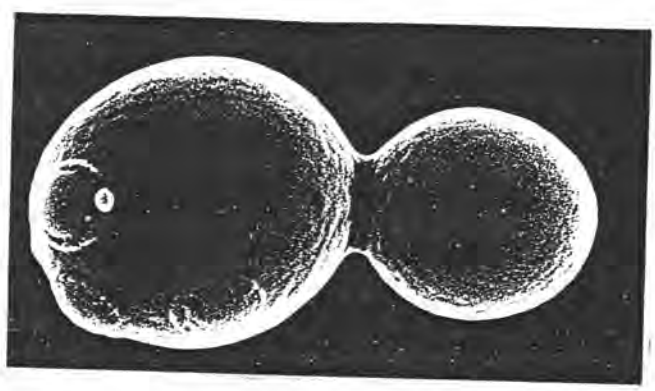
1.1.1 ลักษณะทางชีววิทยาของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae มีอนุกรมพิธานดังนี้ คือจัดอยู่ใน

อาณาจักร (Kingdom)	รา (Fungi)
ดิวีชั่น (Division)	Mycota
สับดิวิชั่น (Sub-Division)	Eumycotina
คลาส (Class)	Ascomycetes
สับคลาส (Sub-Class)	Hemiascomycetidae
ออร์เดอร์ (Order)	Endomycetales
แฟมิลี่ (Family)	Saccharomycetaceae
จีนัส (Genus)	Saccharomyces

(Alexopoulos, 1962)

Saccharomyces cerevisiae มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ค่อนข้างกลม เซลล์เดียว ไม่มีสี ถ้าอายุไม่มาก พบเซลล์ที่กำลังแตกหน่อ ความกว้างของเซลล์อยู่ในช่วง 2.5 - 10.5 ไมครอน (1 ไมครอน = 0.001 มิลลิเมตร) ยาวประมาณ 4.5 - 21 ไมครอน (Reed and Peppler, 1973) เซลล์ยีสต์ 1 เซลล์มีปริมาตรประมาณ 40 ลูกบาศก์ไมครอน และมีน้ำหนักแห้งประมาณ $1*10^{-11}$ กรัม ขนาดของเซลล์ยีสต์ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แสดงในรูปที่ 1.1 (Brock and Madigan, 1991)



รูปที่ 1.1 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Brock and Madigan, 1991)

1.1.2 องค์ประกอบของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์สำหรับทำขนมปัง ดังนั้นองค์ประกอบของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จึงมีองค์ประกอบเหมือนยีสต์แห้งโดยประมาณ ดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ส่วนประกอบของยีสต์แห้ง (White, 1954)

องค์ประกอบ	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง	ค่าเฉลี่ยร้อยละของน้ำหนักแห้ง
คาร์บอน (C)	45.0 - 49.0	47.00
ไฮโดรเจน (H)	5.0 - 7.0	6.00
ออกซิเจน (O)	30.0 - 35.0	32.50
ไนโตรเจน (N)	7.1 - 10.8	8.50
เถ้าทั้งหมด	4.7 - 10.5	6.00
ฟอสเฟต (P_2O_5)	1.9 - 5.5	2.60
โปแตสเซียม (K_2O)	1.4 - 4.3	2.50
แคลเซียม (CaO)	0.005 - 0.2	0.05
แมกนีเซียม (MgO)	0.1 - 0.7	0.40
อลูมิเนียม (Al_2O_3)	0.002 - 0.02	0.005
ซัลเฟต (SO_4)	0.01 - 0.05	0.03
คลอไรด์ (CL)	0.004 - 0.1	0.02
เหล็ก (Fe_2O_3)	0.005 - 0.012	0.007
ทองแดง (Cu)	10 -100 ส่วนในล้านส่วน	20 ส่วนในล้านส่วน

จากตารางที่ 1.1 จะเห็นได้ว่าสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน โดยแร่ธาตุเหล่านี้อยู่ในรูปสารคาร์โบไฮเดรต พวกไกลโคเจน เซลลูโลส และแมนแนน (หรือที่เรียกว่า yeast gum) นอกจากนี้ยังอยู่ในรูปของสารประกอบโปรตีนและกรดนิวคลีอิค (White, 1954) สำหรับสารอนินทรีย์ส่วนใหญ่ (ประมาณร้อยละ 90 ของสารอนินทรีย์ทั้งหมด) ได้แก่ ฟอสฟอรัส และ โปแทสเซียม นอกจากสารที่กล่าวมาข้างต้นแล้วในเซลล์ยีสต์ยังมีวิตามินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกด้วย โดยปริมาณของวิตามินในเซลล์ยีสต์ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 แสดงปริมาณวิตามินของยีสต์ขนมปัง (Nagodawithana, 1991)

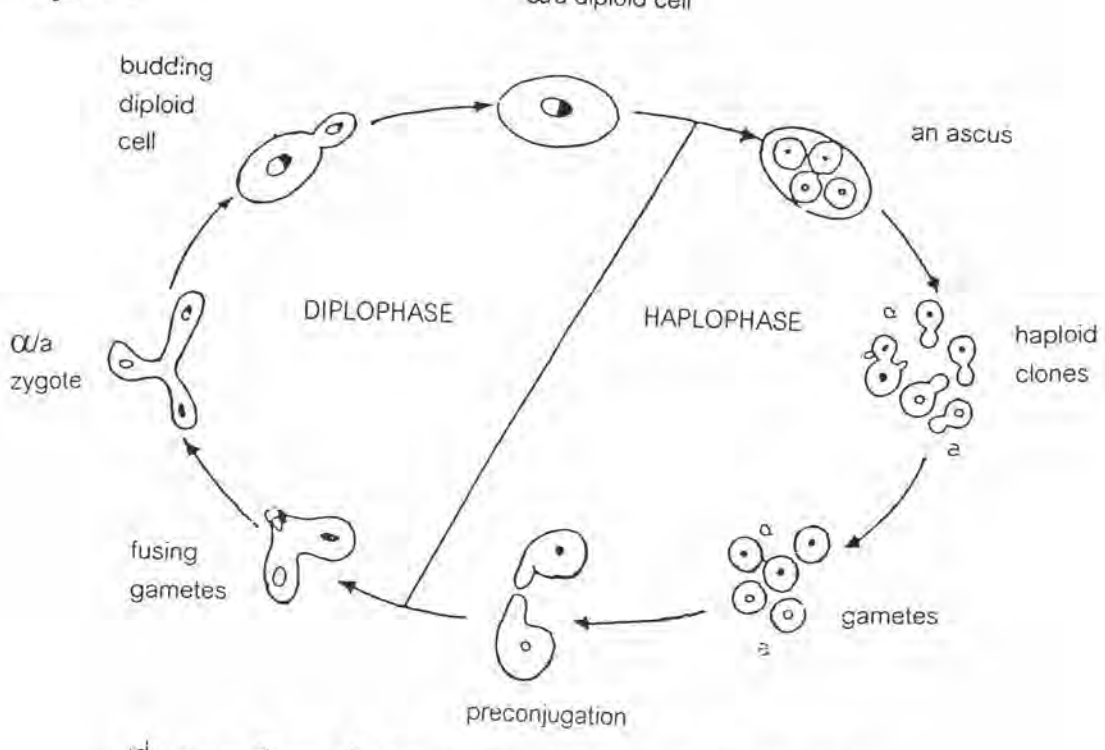
วิตามิน	ปริมาณ (ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง)
ไวตามิน บี12	0.001
ไบโอติน	1.3
โคลีน	4000
กรดโฟลิค	5-13
กรดแพนโทเธนิค	70
ไพริดอกซีน	28
ไรโบฟลาวิน	35-50
ไทอะมิน	60-100
ไนอะซิน	300-500

1.1.3 การขยายพันธุ์และวงจรชีวิตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นราเซลล์เดียว มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ หรือโดยการแบ่งตัวออกเป็นสองเซลล์ บางภาวะมีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ คือมีการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospores) (Trivedi and Jacobson, 1986)

การขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ โดยยีสต์ตัวแม่ (mother cell) มีส่วนใดส่วนหนึ่งของเซลล์ถูกดันโป่งออกแล้วโตขึ้นเรื่อย ๆ เรียกว่า เซลล์ลูก (daughter cell) ขณะเดียวกันนิวเคลียสของมันก็แบ่งตัวด้วย แล้วมีการส่งนิวเคลียสและส่วนต่าง ๆ ในไซโทพลาซึมจากตัวแม่เข้าไปในเซลล์ลูก เมื่อเซลล์ลูกโตเต็มที่เท่าตัวแม่หรือเกือบเท่าตัวแม่ก็จะแยกหลุดออกไปเป็นสองเซลล์ ที่ผิวเซลล์ของตัวแม่เหลือเป็นรอยแผลเรียก บัดสการ์ (bud scar) ยีสต์เซลล์หนึ่งๆ มีบัดสการ์ ประมาณ 12 - 15 รอยแผล ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุของเซลล์ยีสต์ ความสามารถในการแตกหน่อสูงสุดของเซลล์ยีสต์ถูกจำกัดโดยสารอาหารที่จำเป็น หรือความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ในอาหารที่ใช้เลี้ยง ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ถ้าไม่ได้ถูกจำกัดด้วยสารอาหาร หรือความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์แล้ว ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถแตกหน่อได้ตั้งแต่ 9 - 43 ครั้ง และระยะเวลาของการแตกหน่อแต่ละครั้ง (doubling time) ใช้เวลาประมาณ 1.5 - 2 ชั่วโมง (Miller, 1982)

สำหรับการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ ในเซลล์ของยีสต์มีโครโมโซมหลายแบบ (polyploid) คืออาจมีโครโมโซม 1 ชุด (haploid) โครโมโซม 2 ชุด (diploid) โครโมโซม 3 ชุด (triploid) หรือโครโมโซม 4 ชุด (tetraploid) (Reed and Peppler,1973) โดยปกติแล้วยีสต์มีโครโมโซมเป็น 2 ชุด ในภาวะที่ขาดแคลนสารอาหาร ยีสต์มีการสร้างสปอร์ โดยนิวเคลียสแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis) ได้ 4 นิวเคลียส แต่ละนิวเคลียสมีโครโมโซม 1 ชุด แล้วไซโทพลาซึมเข้าล้อมรอบ ต่อมาสร้างผนังเซลล์ขึ้นแล้วกลายเป็นแอสโคสปอร์ โดยผนังเซลล์ยีสต์ทำหน้าที่เป็นถุงแอสคัส (ascus) สปอร์เหล่านี้ทำหน้าที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งมีอยู่ 2 แบบคือ เอ (a) และอัลฟา (α) จากนั้นเกิดการจับคู่กันระหว่างแอสโคสปอร์ ซึ่งมี 2 แบบคือ โฮโมธาลิก (homothallic) และเฮทเทอโรธาลิก (heterothallic) การจับคู่แบบโฮโมธาลิก เป็นการจับคู่ของสองแอสโคสปอร์ที่มีโครโมโซม 1 ชุดเหมือนกัน นิวเคลียสทั้งสองมีลักษณะเหมือนกันและขนาดเท่ากัน เมื่อนิวเคลียสรวมกันได้ยีสต์ที่มีโครโมโซมเป็น 2 ชุดที่เหมือนกัน ส่วนการจับคู่แบบเฮทเทอโรธาลิกเป็นการจับคู่ของสองแอสโคสปอร์ที่นิวเคลียสมีลักษณะแตกต่างกัน เมื่อนิวเคลียสรวมกันได้ยีสต์ที่มีโครโมโซมเป็น 2 ชุด ยีสต์ที่ได้มีนิวเคลียสเป็นไฮบริดนิวเคลียส (hybrid nucleus) และเรียกยีสต์ที่ได้ว่ายีสต์ลูกผสม (hybrid yeast) (Miller, 1982) ดังแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 วงจรชีวิตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Miller, 1982)

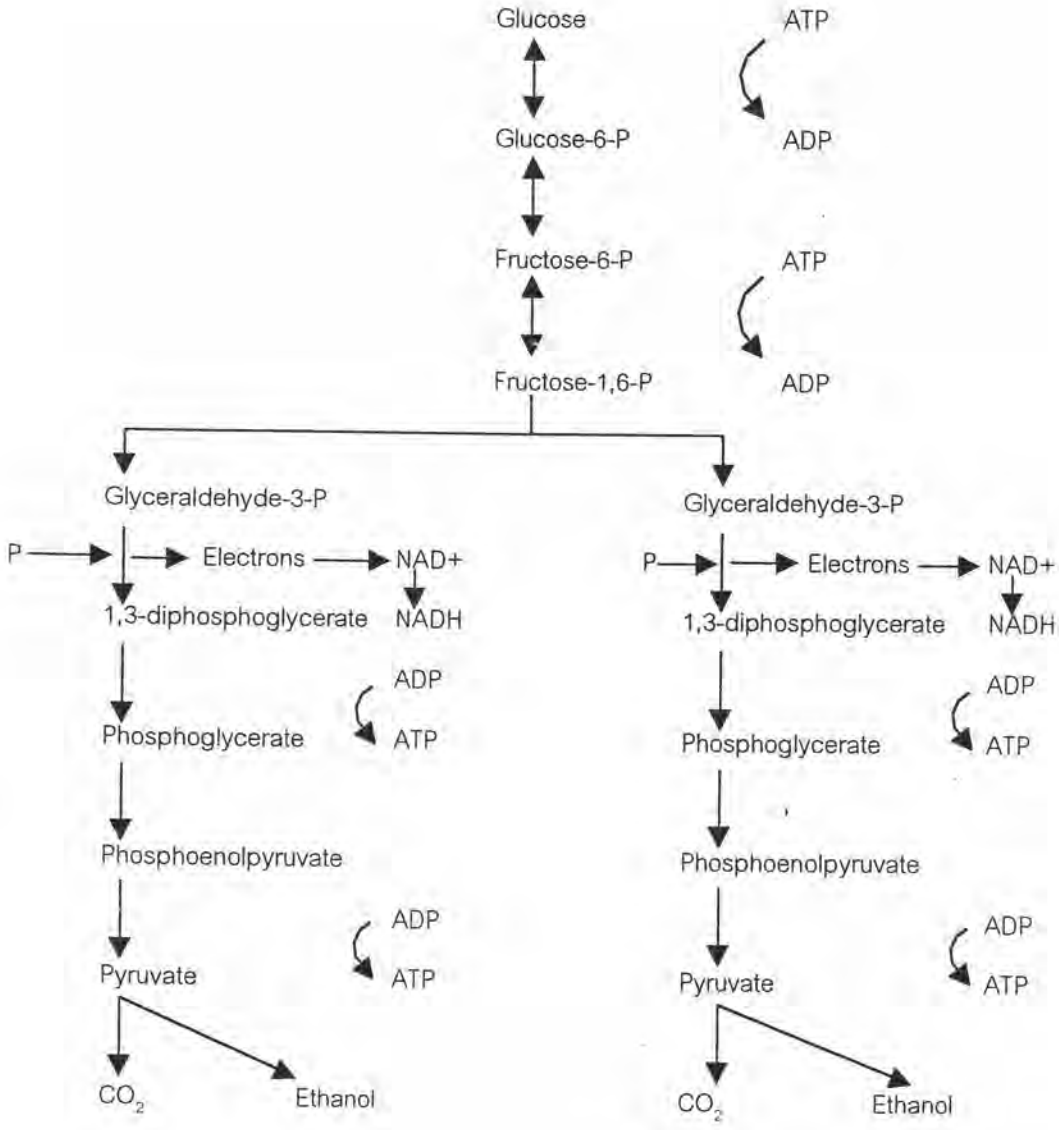
- ● - อัลฟา (α) นิวเคลียส
- ○ - เอ (a) นิวเคลียส
- ◑ - ไฮบริด นิวเคลียส

1.2 ปัจจัยในการเจริญของเซลล์ยีสต์

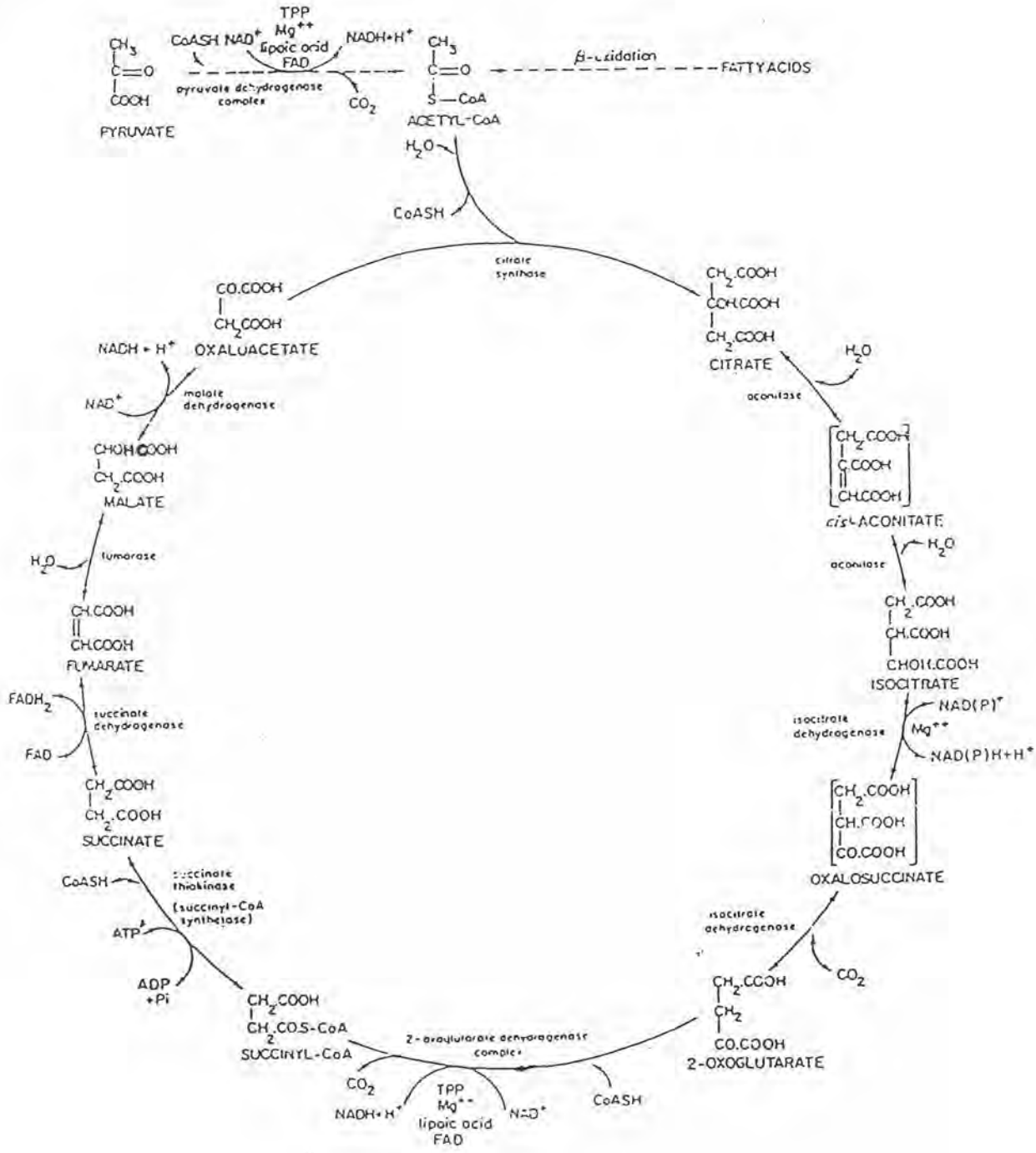
จากองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 1.1.2 ทำให้เราทราบถึงความต้องการสารอาหารของเซลล์ยีสต์ในการเจริญเติบโต โดยแหล่งของสารอาหารมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ดังนี้

1.2.1 แหล่งคาร์บอน

ยีสต์จะใช้สารประกอบคาร์บอนเพื่อเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในเซลล์เพื่อให้ได้พลังงานโดยผ่านวิถีไกลโคไลซีส (glycolytic pathway) (รูป 1.3) และวัฏจักรเครบส์ (รูป 1.4) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ดีในภาวะที่มีอากาศ และจากพลังงานที่ได้จะถูกนำไปใช้ในกิจกรรมการเจริญและการสร้างเซลล์ใหม่ สารประกอบคาร์บอนที่ยีสต์สามารถใช้ได้ดีได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส และซูโครส โดยกลูโคสและฟรุคโตสสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์และเข้าสู่วิถีไกลโคไลซีสได้โดยตรง แต่สำหรับซูโครสและแมนโนส จะถูกย่อยโดยเอนไซม์อินเวอร์เทสที่หลั่งออกมาจากเซลล์ยีสต์ให้กลายเป็นกลูโคสและฟรุคโตสก่อนจึงดูดซึมเข้าสู่เซลล์ โดยเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นเอนไซม์ที่พบได้มากในเซลล์ยีสต์ ส่วนน้ำตาลราฟฟิโนส (raffinose) ซึ่งเป็นน้ำตาลเชิงซ้อนพวกไตรแซคคาไรด์ (trisaccharide) ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้ได้เพียง 1 ใน 3 ของโมเลกุล นอกเหนือจากน้ำตาลเหล่านี้ยีสต์ยังสามารถใช้กรดแลคติก กรดทาร์ทาริค กรดซัคซินิค กรดอะซิติก กรดไกลโคลิค รวมทั้งเอธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้ภาวะที่สารอาหารที่เป็นน้ำตาลมีปริมาณน้อยแต่มีกรดอินทรีย์ในปริมาณมาก ยีสต์ยังสามารถใช้กรดอินทรีย์เหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนได้ บางครั้งกรดอะมิโนอาจถูกนำมาใช้เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้ดีอีกด้วย แต่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่สามารถใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Burrows, 1970)



รูปที่ 1.3 วิถีไกลโคไลซิส (Moat and Foster, 1988)



รูปที่ 1.4 วัฏจักรเครบส์ หรือวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิก (Singleton and Sainbury 1988)

ในอุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ส่วนใหญ่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งมีราคาถูก โดยทั่วไปกากน้ำตาลสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดคือ

1. blackstrap molasses หรือ final molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 50 - 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในอุตสาหกรรมหมักจะใช้กากน้ำตาลชนิดนี้เป็นวัตถุดิบ

2.refinery molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์

3.hightest molasses หรือ invert molasses คือกากน้ำตาลที่ผลิตขึ้นโดยการนำน้ำอ้อยมาเคี่ยวจนข้นเป็นน้ำเชื่อม มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 77 เปอร์เซ็นต์

(ภัทรา มณีธวัช,2520; Paturau, 1989)

ในอุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ส่วนใหญ่นิยมใช้กากน้ำตาล blackstrap molasses เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีองค์ประกอบซับซ้อน ประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำตาลต่าง ๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส ราฟฟิโนส และเกลือแร่ต่าง ๆ ส่วนที่เหลือจะประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ใช่น้ำตาลซึ่งละลายได้ในด่าง (alkali soluble nonsugar ingredient) สารประกอบอนินทรีย์และน้ำ (Underkofler and Hickley, 1954; Eero and Merrja, 1983) ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 องค์ประกอบของกากน้ำตาล (White,1954)

ส่วนประกอบ	Blackstraps cane molasses
ธาตุอาหาร (ร้อยละของน้ำหนัก)	
น้ำตาลรีดิวส์ทั้งหมด	50-65
ไนโตรเจนทั้งหมด	0.4-1.5
แอลฟา-อะมิโนไนโตรเจน (N)	0.05
ฟอสฟอรัส (P_2O_5)	0.2-9.0
แคลเซียม (CaO)	0.1-1.3
แมกนีเซียม (MgO)	0.3-1.0
โปแตสเซียม (K_2O)	2.6-5.0
สังกะสี (Zn)	0.1-0.2
เหล็ก (Fe_2O_3)	0.1

ตารางที่ 1.3 (ต่อ) องค์ประกอบของกากน้ำตาล (White,1954)

ส่วนประกอบ	Blackstraps cane molasses
คลอไรด์ (Cl)	1.7
ทองแดง (Cu)	0.02
อื่น ๆ	0.2
เถ้าทั้งหมด	7-11
วิตามิน (ไมโครกรัมต่อกรัม)	
ไบโอติน	0.6-3.2
แคลเซียม แพนโทเธเนท	20-120
อินโนซิทอล	6000
ไทอะมิน	1.4-8.3
ไพริดอกซีน	6-7
ไรโบฟลาวิน	2.5
นิโคตินามาย	20-25
กรดโฟลิค	0.04

จากตารางที่ 1.3 จะเห็นได้ว่านอกจากในกากน้ำตาลจะมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญแล้ว ในกากน้ำตาลยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์อีกด้วย ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อต่อ ๆ ไป

1.2.2 แหล่งไนโตรเจน

ยีสต์ใช้แอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้เร็วกว่าสารประกอบไนโตรเจนอื่น โดยเมื่อผ่านเข้าสู่เซลล์มันจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิค และองค์ประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้ยูเรียและกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้แต่ใช้ได้ช้ากว่าแอมโมเนียมไอออน จากการศึกษาของ Aibers และคณะ (Albers et al., 1996) ซึ่งเปรียบเทียบการใช้แอมโมเนียมไอออนและกรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า การใช้แอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถให้อัตราการเจริญจำเพาะ 0.45 ต่อชั่วโมง ใน

ขณะที่ใช้กรดกลูตามิกเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถให้อัตราการการเจริญจำเพาะเพียง 0.33 ต่อชั่วโมง จะเห็นได้ว่า การใช้แอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าการใช้กรดกลูตามิกเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่สำหรับสารประกอบไนเตรทและไนไตรท์ยีสต์ไม่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Burrows, 1970; Chen and Chiger, 1985)

สำหรับไนโตรเจนในกากน้ำตาลส่วนใหญ่อยู่ในรูปของโปรตีน กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิค (Paturau, 1989) ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับยีสต์ได้ แต่มีในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับความต้องการของยีสต์ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์

1.2.3 ฟอสฟอรัส

ยีสต์จะใช้ฟอสฟอรัสในการสร้าง ATP สังเคราะห์นิวคลีโอโปรตีนและสารอื่น ๆ ในเซลล์ และฟอสฟอรัสยังช่วยเป็นบัฟเฟอร์รักษาค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย (Rose and Harrison, 1970) สำหรับในกากน้ำตาลฟอสฟอรัสอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตซึ่งยีสต์ไม่สามารถนำมาใช้ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมฟอสฟอรัสในรูปของสารประกอบฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้เช่น แอมโมเนียมฟอสเฟต หรือเกลืออัลคาไลน์ฟอสเฟต ลงในอาหารสำหรับผลิตเซลล์ด้วย เพื่อเป็นการเพิ่มแหล่งฟอสฟอรัสแก่ยีสต์ (White, 1954; Reed and Nagodawithana, 1991)

1.2.4 ซัลเฟอร์

ซัลเฟอร์ในรูปของซัลเฟต จะผ่านเข้าสู่เซลล์ยีสต์โดย active transport ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์เพอร์มิเอส (permease) (Jones, Pamment and Greenfield, 1981)

1.2.5 วิตามิน

วิตามินมีบทบาทสำคัญในการควบคุมเมตาบอลิสมของยีสต์ โดยจะเป็นโคเอนไซม์ หรือสารตั้งต้น (precursors) ที่สำคัญในการทำงานของเอนไซม์ (Jones et al., 1981) วิตามินที่สำคัญต่อการเจริญของยีสต์ได้แก่ ไบโอติน กรดแพนโตทีนิค และอินโนซิทอล ซึ่งโดยทั่วไปกากน้ำตาลมีวิตามินเหล่านี้อยู่เพียงพอ (Rose and Harrison, 1971; Rosen,1977)

1.2.6 ธาตุอาหารอื่น ๆ

ธาตุอาหารอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม และแคลเซียม นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการธาตุอาหารที่จำเป็นในปริมาณที่น้อยมาก ได้แก่ เหล็ก สังกะสี และทองแดง ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้มีเพียงพอในกากน้ำตาล (Paturau 1989; Reed and Nagodawithama, 1991)

1.2.7 ออกซิเจน

ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน การสร้างพลังงานของยีสต์เมื่อผ่านวิถีไกลโคไลซีสแล้ว กรดไพรูวิก (pyruvic acid) จะไม่ผ่านเข้าวัฏจักรเครบส์แล้วเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) แต่มันจะเปลี่ยนไปเป็นเอธานอลแทน ทำให้พลังงานที่ได้มีน้อย การเจริญของยีสต์จึงไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการให้ออกซิเจนแก่ระบบ จึงจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ การให้ออกซิเจนแก่ระบบจะให้ในรูปของอากาศ เนื่องจากออกซิเจนบริสุทธิ์มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Burrows, 1970; Chen and Chiger, 1985)

1.2.8 อุณหภูมิ

ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิตั้งแต่ 20 - 40 องศาเซลเซียส (White, 1954) แต่จะมีอุณหภูมิหนึ่งที่ให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารอาหารเป็นเซลล์สูงที่สุด (optimum temperature) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากในการเจริญของยีสต์จะมีการปล่อยพลังงานความร้อนออกมาประมาณ 3.5-4.4 กิโลแคลลอรี่ต่อกรัมของยีสต์ (Nagodawithana, 1991) จึงทำให้อุณหภูมิของระบบสูงขึ้น เพื่อให้ระบบสามารถรักษาประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารอาหารเป็นเซลล์ จึงจำเป็นต้องมีการหล่อเย็นเพื่อรักษาอุณหภูมิให้คงที่ และเพื่อเป็นการประหยัดพลังงานในการหล่อเย็น ในอุตสาหกรรมจึงพยายามปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูง ซึ่งในอุตสาหกรรมยีสต์ส่วนใหญ่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 - 35 องศาเซลเซียส

1.2.9 ค่าความเป็นกรดด่าง

ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 3.5 - 7.0 (Rose and Harrison, 1971) ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* คือ 4.5 (Jones et al., 1981) ในอุตสาหกรรมหมัก จะมีการปรับความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 3.5 - 4.5 เพื่อให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม และเป็นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนด้วย ความสามารถในการรักษาค่าความเป็นกรดด่างในอาหาร (buffering capacity) เป็นสิ่งสำคัญเพื่อรักษาประสิทธิภาพการเจริญของยีสต์ได้ตลอดกระบวนการหมัก (Prescott and Dunn, 1959) ซึ่งโดยทั่วไปในระหว่างการเจริญเติบโตของยีสต์ในน้ำหมักเกิดปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อนำสารอาหารที่มีอยู่ในน้ำหมักไปใช้ในการเจริญเติบโต และจะมีการสร้างกรดออกมาจากปฏิกิริยาทางเคมีเหล่านี้ ดังนั้นเพื่อเป็นการรักษาค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องใช้สารควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เพื่อรักษาค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

1.3 อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

จากสมการการเจริญของจุลินทรีย์ได้กล่าวว่า อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ ณ เวลาหนึ่งเท่ากับผลคูณของอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) ที่เวลานั้นกับความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักขณะนั้น ($dx/dt = \mu x$) (Aiba, Humphrey and Millis, 1973) จะเห็นได้ว่า อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับทั้งความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำหมักและอัตราการเจริญจำเพาะ ตามที่กล่าวมาแล้ว เซลล์ยีสต์ก็เช่นกัน ตามสมการที่กล่าวมานี้เมื่อต้องการเพิ่มอัตราการเจริญของยีสต์ก็จะต้องทำการเพิ่มอย่างใดอย่างหนึ่งระหว่างความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นกับอัตราการเจริญจำเพาะ ถ้าเลือกเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นก็ต้องใช้ปริมาณหัวเชื้อที่มากซึ่งจะเป็นการสิ้นเปลืองทั้งเวลาในการเพาะหัวเชื้อและค่าใช้จ่าย ซึ่งในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปมีการควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ในน้ำหมักเริ่มต้น โดยกำหนดการเติมหัวเชื้อลงในน้ำหมักประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร:ปริมาตร) ของน้ำหมักทั้งหมด (ดวงพร คันธโชติ, 2530) ดังนั้นความพยายามที่จะเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะจึงน่าจะถูกพิจารณามากกว่า โดยถ้าภาวะใดให้อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อสูง แสดงว่าภาวะนั้นเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อชนิดนั้น ๆ สำหรับในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปจึงมีอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์อยู่ในช่าง 0.05 - 0.3 ต่อชั่วโมง (Burrows , 1970)

1.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องมีภาชนะขนาดใหญ่ซึ่งสามารถควบคุมภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญได้ ถังหมักจึงต้องมีการออกแบบอย่างดี และมีเครื่องมือที่ใช้ควบคุมภาวะต่าง ๆ ด้วย

1.4.1 ถังหมัก

ถังหมักที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการทดลองต่าง ๆ จะทำด้วยแก้วโปร่งใส มีลักษณะเป็นทรงกระบอก เพื่อสะดวกในการสังเกตขณะทำการทดลอง ภายในถังประกอบด้วยใบพัดสำหรับกวนอาหาร ท่อพ่นอากาศ และบัฟเฟิล (baffle) ซึ่งช่วยให้อาหารและอากาศผสมคลุกเคล้ากันได้ดี ป้องกันไม่ให้อาหารหมุนไปตามแรงของการกวน จนเกิดเป็นลักษณะโพรงตรงกลางคล้ายสะดือทะเล (vortex) ซึ่งจะทำให้เกิดการสูญเสียประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนออกซิเจนระหว่างน้ำหมักกับบรรยากาศ สำหรับปริมาตรของน้ำหมักไม่ควรเกิน 75% ของความจุถังหมัก ทั้งนี้เพื่อป้องกันฟองล้นออกนอกถังหมัก ซึ่งเป็นสาเหตุของการสูญเสียปริมาตรของน้ำหมักระหว่างการหมัก และการปนเปื้อนด้วย (Nagodawithana, 1991)

1.4.2 ระบบควบคุมการหมัก

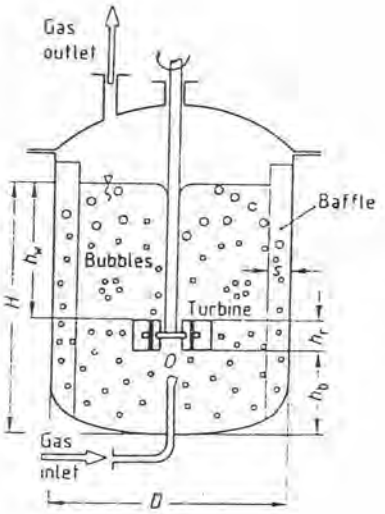
1.4.2.1 การให้อากาศ

ปกติการให้อากาศแก่ถังหมักทำได้โดย เครื่องอัดอากาศถ่ายโอนอากาศผ่านเข้าเครื่องกรองอากาศที่สามารถกรองจุลินทรีย์ได้ เครื่องกรองอากาศจะต่อเข้ากับถังหมัก เมื่ออากาศผ่านเครื่องกรองอากาศแล้วพ่นเข้าสู่น้ำหมักที่ก้นถังหมัก ฟองอากาศที่ออกมาจะต้องมีขนาดเล็กพอสมควร เพื่อให้ออกซิเจนในอากาศซึมผ่านสู่อาหารเหลวได้ดี ฟองอากาศที่มีขนาดเล็กมากเกินไปจะเป็นสาเหตุให้เกิดฟองเหนือผิวน้ำหมักปริมาณมาก แต่ถ้าฟองอากาศใหญ่เกินไป การซึมผ่านของออกซิเจนจากอากาศสู่น้ำหมักไม่ดีนัก (Nagodawithana, 1991)

อย่างไรก็ตามการให้อากาศเข้าไปในระหว่างการหมัก จำเป็นต้องควบคุมปริมาณให้คงที่และพอเหมาะต่อการใช้ของจุลินทรีย์ถ้ามากเกินไปอาจก่อปัญหาตามมาในระหว่างการหมัก เช่น การเกิดฟอง ดังนั้นจึงต้องใช้เครื่องคุมอัตราการให้อากาศ (flow meter) ควบคุมการให้อากาศเข้าสู่น้ำหมักภายในถังหมัก

1.4.2.2 การกวน

การกวนเป็นการทำให้อาหาร เซลล์ยีสต์ และอากาศผสมกันได้อย่างทั่วถึง ระบบการกวนที่มีประสิทธิภาพจะทำให้การละลายของออกซิเจนในน้ำหมักมีค่าสูงและมีปริมาณเท่า ๆ กันทุกจุดในถังหมัก โดยช่วยในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปจากก้นถังหมักให้เป็นฟองขนาดเล็ก และแตกกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของน้ำหมัก ดังแสดงในรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 แบบร่างของถังหมักที่มีการกวน (Brauer, 1985)

1.4.2.3 การควบคุมอุณหภูมิ

ในการควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักในถังหมักโดยทั่วไปประกอบด้วย ระบบหล่อเย็นกับตัวทำความร้อน โดยอาศัยการทำงานจากแท่งวัดอุณหภูมิ (temperature sensing probe) ที่อยู่ในถังหมัก เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นสัญญาณจากแท่งควบคุมอุณหภูมิถูกส่งเข้าเครื่องควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณมาตรฐานที่ตั้งไว้ตามอุณหภูมิที่ต้องการ ถ้าสัญญาณสูงกว่ามาตรฐานที่ตั้งไว้ ก็จะไปกระตุ้นให้วาล์วเปิดออก น้ำเย็นก็จะเข้ามาหล่อเย็นถังหมักได้ ในขณะที่ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่าที่กำหนดไว้ ก็จะมีสัญญาณไปกระตุ้นให้เครื่องทำความร้อนทำงานโดยจะมีแท่งวัดอุณหภูมิสอดเข้าไปสัมผัสกับน้ำหมักโดยตรง ซึ่งสามารถอ่านอุณหภูมิได้จากเครื่องบันทึกภายนอกถังหมัก

1.4.2.4 การควบคุมความเป็นกรดด่าง

การควบคุมให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักอยู่ในช่วงที่พอเหมาะ ทำได้โดยอาศัยเครื่องมือวัดและควบคุมซึ่งประกอบด้วย เครื่องควบคุมซึ่งมีหน้าปัดสำหรับอ่านค่าความเป็นกรดด่าง แท่งวัดความเป็นกรดด่าง (pH probe) และปั๊ม (pump) สำหรับเติมกรดและด่างเข้าถังหมัก เมื่อค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเปลี่ยนไปจากช่วงที่เหมาะสมต่อการหมัก เครื่องบันทึกและควบคุมจะส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังปั๊มทำให้กรดหรือด่างไหลลงสู่ถังหมัก จนกระทั่งค่าความเป็นกรดด่างปรับมาอยู่ในระดับที่ต้องการ

1.4.2.5 การกำจัดฟอง

อากาศที่พ่นเข้าไปในถังและถูกใบพัดกวนแตกเป็นฟองอากาศเล็ก ๆ มากมายทำให้เกิดฟองขึ้นบริเวณผิวหน้าของน้ำหมัก โดยจะเกิดขึ้นมากขณะที่มีการเจริญของเซลล์ยีสต์ เนื่องมาจากสารประกอบบางชนิดที่ถูกขับถ่ายออกมาระหว่างการเจริญ ทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้น ฟองที่เกิดนี้ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทอากาศระหว่างน้ำหมักกับบรรยากาศลดต่ำลง เนื่องจากมีการระเหยของน้ำและสารที่ระเหยได้ง่าย นอกจากนั้นถ้ามีฟองมากจนล้นออกนอกถังหมัก ฟองอากาศที่แตกสลายกลับลงไปในถัง อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้

ในปัจจุบันการกำจัดฟองทำได้โดยใช้ใบพัดสำหรับตีฟองให้แตกติดตั้งอยู่เหนือระดับน้ำหมักพอสมควร และประกอบกับการเติมสารกำจัดฟอง (antifoam) ในปริมาณเล็กน้อยทำให้ฟองสลายตัวได้รวดเร็ว เนื่องจากสารนี้ไปลดเสถียรภาพของฟอง แต่อย่างไรก็ตามการเติมสารกำจัดฟองมากเกินไป นอกจากจะเป็นการสิ้นเปลืองแล้ว ยังส่งผลให้คุณสมบัติการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักลดลงด้วย (Finn, 1967)

1.4.3 ระบบการหมัก

ระบบการหมักในอุตสาหกรรม แบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือระบบปิดและระบบเปิด

1.4.3.1 ระบบปิด

เป็นระบบที่ส่วนประกอบที่สำคัญในการหมัก ไม่สามารถนำเข้าหรือเอาออกจากระบบได้ การหมักระบบนี้มีการเติมสารอาหารลงไปในช่วงแรกของการหมักเท่านั้น เชื้อจะใช้อาหารในการเจริญเติบโตเรื่อย ๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการเจริญเนื่องจากสารอาหารลดลงหรือ เกิดการสะสมสารพิษ จะเห็นว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อในการหมักระบบปิด จะอยู่ในภาวะที่ไม่คงที่สม่ำเสมอ (transient state) โดยอัตราการเจริญจำเพาะจะสูงสุดเมื่อเชื้ออยู่ในช่วงที่มีการเจริญแบบเท่าทวีคูณ (exponential phase) ดังนั้นอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate) จึงถูกจำกัดด้วยปริมาณของสารอาหารตั้งต้น คือถ้ามีสารอาหารตั้งต้นมาก ๆ น่าจะส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะสูง เนื่องจากสารอาหารไม่เป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญ แต่การเพิ่มสารอาหารตั้งต้นมากเกินไปกลับส่งผลให้อัตราการเจริญสูงสุดลดลง โดยเมื่อพิจารณาการศึกษาของ Thatipamala และคณะ (Thatipamala, Rohani and Hill,1992) ปรากฏว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นจาก 20 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 80 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของยีสต์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่การเพิ่มปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นจาก 20 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 80 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ได้นานยิ่งขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นไปเป็น 100 กรัมต่อลิตร หรือมากกว่านั้น นอกจากจะไม่สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ให้นานมากกว่าเดิมได้แล้ว ยังส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดลดลงอีกด้วย ดังนั้นการหมักแบบระบบปิด หรือเรียกอีกอย่างว่าการหมักแบบแบช (batch fermentation) จึงมีข้อจำกัดคือไม่สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ได้นาน ถึงแม้ว่าการเพิ่มปริมาณสารอาหารตั้งต้น จะสามารถเพิ่มเวลาในการรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ได้ในระยะสั้น ๆ แต่เมื่อเพิ่มสารอาหารตั้งต้นมากเกินไปกลับส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดลดลง

อย่างไรก็ตาม มีการดัดแปลงการหมักแบบแบช กล่าวคือ ใช้ปริมาณสารอาหารตั้งต้นต่ำ เพื่อไม่ให้ความเข้มข้นของสารอาหารตั้งต้นมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ จากนั้นมีการเติมสารอาหารเข้าไปในระหว่างการหมัก เพื่อเพิ่มปริมาณสารอาหาร (เพราะสารอาหารเดิมลดลงมาก) หรือเพื่อเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์สารประกอบบางอย่าง เราเรียกกระบวนการที่ดัดแปลงนี้ว่า การหมักแบบเฟดแบช (fed batch fermentation) กระบวนการนี้ยังถือว่าเป็นระบบปิด เพราะไม่มีการนำน้ำหมักออกมาอย่างต่อเนื่อง

1.4.3.2 ระบบเปิด

เป็นระบบที่ส่วนประกอบของระบบสามารถนำเข้าและออกจากถังหมักได้อย่างต่อเนื่อง กล่าวคือมีการนำเข้าสารอาหารอย่างต่อเนื่องในขณะเดียวกันนำเอาเซลล์หรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ในรูปของน้ำหมักออกจากถังหมักอย่างต่อเนื่องในปริมาตรที่เท่ากัน จึงเรียกระบบนี้ว่า การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) ซึ่งจะเห็นได้ว่าระบบนี้มีการเติมสารอาหารเข้าสู่ระบบตลอดเวลา สารอาหารจึงไม่เป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญ นอกจากนี้ยังมีการนำเซลล์และสารผลิตภัณฑ์ออกจากระบบ จึงส่งผลให้จำกัดการสะสมของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ ดังนั้นระบบนี้จึงน่าจะสามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ได้นาน ๆ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์สำหรับทำขนมปังแบบต่อเนื่อง ได้เริ่มต้นครั้งแรกในโรงงานหนึ่งในประเทศอังกฤษ โดยระบบดำเนินการติดต่อกันถึง 5 วัน (Olson, 1961; Sher, 1961)

1.5 **ทฤษฎีการหมักแบบต่อเนื่อง** (Aiba et al.,1973)

ในการศึกษาทางจลศาสตร์ของการหมักแบบต่อเนื่องจำเป็นต้องได้ข้อมูลทางจลศาสตร์ของการหมักแบบแบช ในภาวะเดียวกันเสียก่อนเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคำนวณหาตัวแปรอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการหมักให้อยู่ในภาวะที่เกิดความสมดุลย์ของความเข้มข้นของเซลล์ภายในถังหมัก ซึ่งเรียกว่าภาวะคงที่สม่ำเสมอ (steady state) เพื่อให้ได้ผลผลิตต่อเวลาที่สูงที่สุดโดยเสียค่าใช้จ่ายต่ำที่สุด

ในการวิเคราะห์หาค่าต่าง ๆ จำเป็นจะต้องตั้งสมมุติฐานที่ว่าการหมักกระทำในถังซึ่งมีระบบการกวนที่ดีพอที่จะทำให้ส่วนประกอบ และอนุภาคต่าง ๆ ของของเหลวในถังหมักอยู่ในสภาพเนื้อเดียวกัน (homo geneous)

ดังนั้นสมการสมดุลย์มวล (mass balance) ภายในถังหมักจะเขียนได้ในรูปของ

การเปลี่ยนแปลงภายในถังหมัก = การเพิ่มเนื่องจากการเติมเซลล์พร้อมสารอาหารเข้าสู่ระบบ
+ การเพิ่มเนื่องจากการเจริญของเซลล์
- การลดลงของเซลล์เนื่องจากการเอาน้ำหมักออกจากระบบ
- การลดลงของเซลล์เนื่องจากการตาย

$$dx/dt = x'.F/V + [dx/dt]_G - x.F/V - [dx/dt]_D \longrightarrow (1)$$

โดย

x = ความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

x' = ความเข้มข้นของเซลล์ในสารอาหารสำหรับเติมเข้าสู่ระบบ (กรัมต่อลิตร)

$[dx/dt]_G$ = อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของเซลล์เนื่องจากการเจริญ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$[dx/dt]_D$ = อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของเซลล์เนื่องจากการตาย (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

F = อัตราการไหล (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรของน้ำหมักภายในถังหมัก (ลิตร)

$[dx/dt]_G$ คืออัตราการเจริญ และ $[dx/dt]_D$ คือ อัตราการตาย ซึ่งอาจสรุปได้ว่า dx/dt หมายถึงการเปลี่ยนแปลงสุทธิของความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมักเนื่องมาจากอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ

จากสมการ ที่ว่า

$$dx/dt = \mu x$$

โดย μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ

เมื่อนำมารวมกับสมการ (1) จะได้ว่า

$$dx/dt = x'.F/V + \mu.x - x.F/V - \mu_D.x$$

ในทางปฏิบัติมักไม่ค่อยคำนึงถึงอัตราการตาย ดังนั้น $\mu_D = 0$ และยังใช้ค่าอัตราการเจือจาง (dilution rate; D) แทน F/V ดังนั้น

$$dx/dt = D(x' - x) + \mu.x$$

$$= D.x' + x(\mu - D)$$

ค่าอัตราการเจือจางมีหน่วยเป็นต่อชั่วโมง หมายถึงปริมาตรสัมพัทธ์ของของเหลวที่ถูกแทนที่ในถังหมัก ซึ่งค่าส่วนกลับของ D ก็คือระยะเวลาโดยเฉลี่ยที่แต่ละอนุภาคของสารที่เติมเข้าสู่ระบบจะอยู่ภายในถังหมักก่อนที่จะไหลออกจากถัง (retention time)

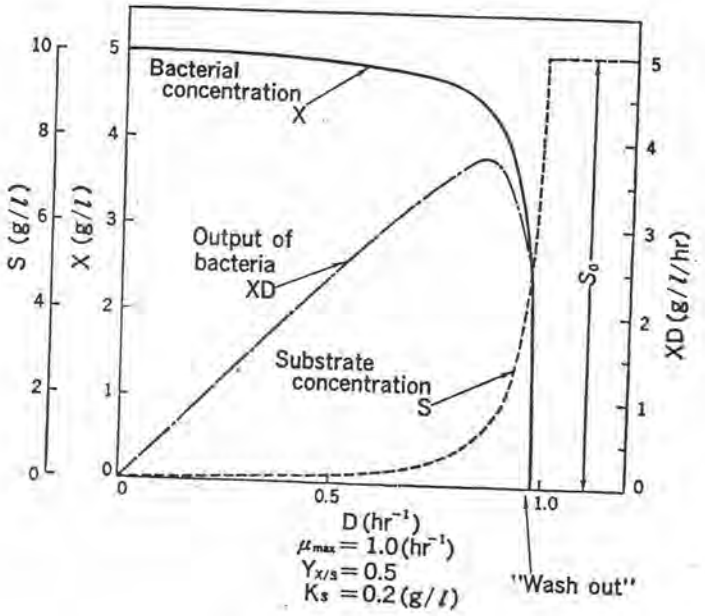
ในการหมักโดยทั่วไป สารอาหารที่เติมเข้าสู่ระบบจะอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้น x' = 0 สมการข้างต้นจึงเป็น

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

และในภาวะคงที่สม่ำเสมอ (steady state) ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของเซลล์ ดังนั้น dx/dt = 0 จะได้ว่า

$$\mu = D$$

นั่นแสดงว่า ในการหมักแบบต่อเนื่อง สามารถควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อได้โดยการควบคุมอัตราการเจือจาง ที่อัตราการเจือจางหนึ่งจะส่งผลให้น้ำหมักมีความเข้มข้นของเชื้อและความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลือค่าหนึ่ง และเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจาง จะส่งผลให้ในน้ำหมักมีความเข้มข้นของเชื้อลดลงและความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลือเพิ่มขึ้น จนกระทั่งเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางมากเกินกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของเชื้อ เชื้อจะถูกชะออกจากระบบจนหมด (wash out) และสารอาหารไม่ถูกใช้ ดังแสดงในรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง S_1 VS D และ X_1 VS D (จากการคำนวณ)

โดยที่ D = อัตราการเจือจาง ; S_1 = ความเข้มข้นของสารอาหาร

X_1 = ความเข้มข้นของเซลล์ ; X, D = อัตราการผลิตเซลล์

ในกรณีนี้ μmax X = 1.0 hr^{-1}; $Y_{x/s}$ = 0.5; S0 = 10 g/l; Ks = 0.2 g/l

(Aiba, et al., 1973)

การเลือกอัตราการเจือจางที่เหมาะสม ควรใช้หลาย ๆ ปัจจัยในการพิจารณา โดยเฉพาะต้นทุนการผลิต และผลผลิตต่อชั่วโมง โดยถ้าได้ผลผลิตต่อชั่วโมงและผลผลิตต่อสารอาหารที่ใช้ไปสูง แสดงว่าเราได้ผลิตภัณฑ์มากในขณะที่ใช้เวลาน้อย และใช้ต้นทุนต่ำ จึงเป็นผลดีต่อการผลิต

1.6 การนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่

เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์แบบต่อเนื่องจะมีสารผ่านเข้าและออกจากระบบตลอดเวลา โดยน้ำหมักที่ถูกปล่อยออกจากระบบจะเข้าสู่กระบวนการแยกเซลล์ออกจากส่วนน้ำ และเซลล์จะถูกนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว สำหรับส่วนที่จะถูกนำไปผ่านกระบวนการบำบัดมีปริมาณมาก จึงเป็นปัญหาต่อการบำบัด และในน้ำหมักที่ผ่านการแยกเซลล์ออกแล้วน่าจะมีสารอาหารที่เหลือบางส่วนซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ สารที่เซลล์สร้างขึ้นระหว่างการเจริญซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ โดยเฉพาะเอธานอล นอกจากนี้ยังมีสีของกากน้ำตาลและสารที่เป็นของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble solid) และเถ้าเพิ่มขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญของยีสต์ทั้งสิ้น

ดังนั้น การนำส่วนน้ำที่ผ่านกระบวนการหมักแล้วมาใช้เจือจางกากน้ำตาลและเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะเติมลงในระบบอีกครั้ง จึงน่าจะเป็นหนทางในการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัด และยังเป็นการประหยัดน้ำ รวมทั้งเป็นการนำสารอาหารที่เหลือในน้ำหมักกลับมาใช้ประโยชน์อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามการนำส่วนน้ำที่ผ่านกระบวนการหมักกลับมาใช้เจือจางกากน้ำตาลและเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมลงในระบบอีกครั้งมีข้อจำกัด เนื่องจากในน้ำหมักมีสารที่เซลล์สร้างขึ้นระหว่างการเจริญซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในตอนต้น ดังนั้นการนำน้ำหมักเวียนกลับมาใช้ใหม่หลาย ๆ ครั้ง จึงน่าจะส่งผลให้ความสามารถในการผลิตเซลล์ยีสต์ของระบบลดลง

1.7 มูลเหตุจูงใจ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงยีสต์มีกระบวนการ 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ ขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณเซลล์และขั้นตอนในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเซลล์มีจุดมุ่งหมายต้องการเซลล์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในปริมาณมากขณะที่ใช้เวลาในการเลี้ยงเซลล์น้อย หรือในอีกนัยหนึ่งคือต้องการให้มีอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์สูง ๆ และยังคงมีประสิทธิภาพดีเหมือนเดิมนั่นเอง

งานวิจัยนี้จึงพยายามหาภาวะเพื่อให้ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูง ๆ และสามารถรักษาค่าอัตราการเจริญจำเพาะนั้นไว้ได้นาน ๆ โดยใช้ระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง และใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้นแบบ ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิดโดยเฉพาะอุตสาหกรรมการผลิตเอธานอล การผลิตยีสต์ขนมปัง และการผลิตสารสกัดที่ได้จากเซลล์ยีสต์

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการนำน้ำหมักกลับมาใช้เจือจางกากน้ำตาลและเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมลงในระบบอีกครั้ง เพื่อเป็นหนทางในการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัด รวมทั้งเป็นการนำสารอาหารที่เหลือในน้ำหมักกลับมาใช้ประโยชน์อีกทางหนึ่งด้วย

1.8 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

เพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ด้วยระบบต่อเนื่องให้มีอัตราการเจริญจำเพาะสูง โดยที่มีผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูง และสามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะนั้นไว้ได้นาน ๆ โดยทราบระยะเวลาที่สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะไว้ได้ รวมทั้งศึกษาผลของการนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่ต่อการรักษาอัตราการเจริญจำเพาะ

1.9 ขั้นตอนของงานวิจัย

1.ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในกากน้ำตาลต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SG1 ในการหมักแบบขวดเขย่า เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่ให้อัตราการเจริญแพร่พันธุ์จำเพาะสูงที่สุด สำหรับใช้เป็นความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง

2.หาภาวะของการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ให้อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SG1 สูง โดยที่มีผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้สูง

3.ศึกษาระยะเวลาที่สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ได้ ในการหมักแบบต่อเนื่อง

4.ศึกษาผลของการนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่ต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SG1