บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเจริญของยีสต์ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

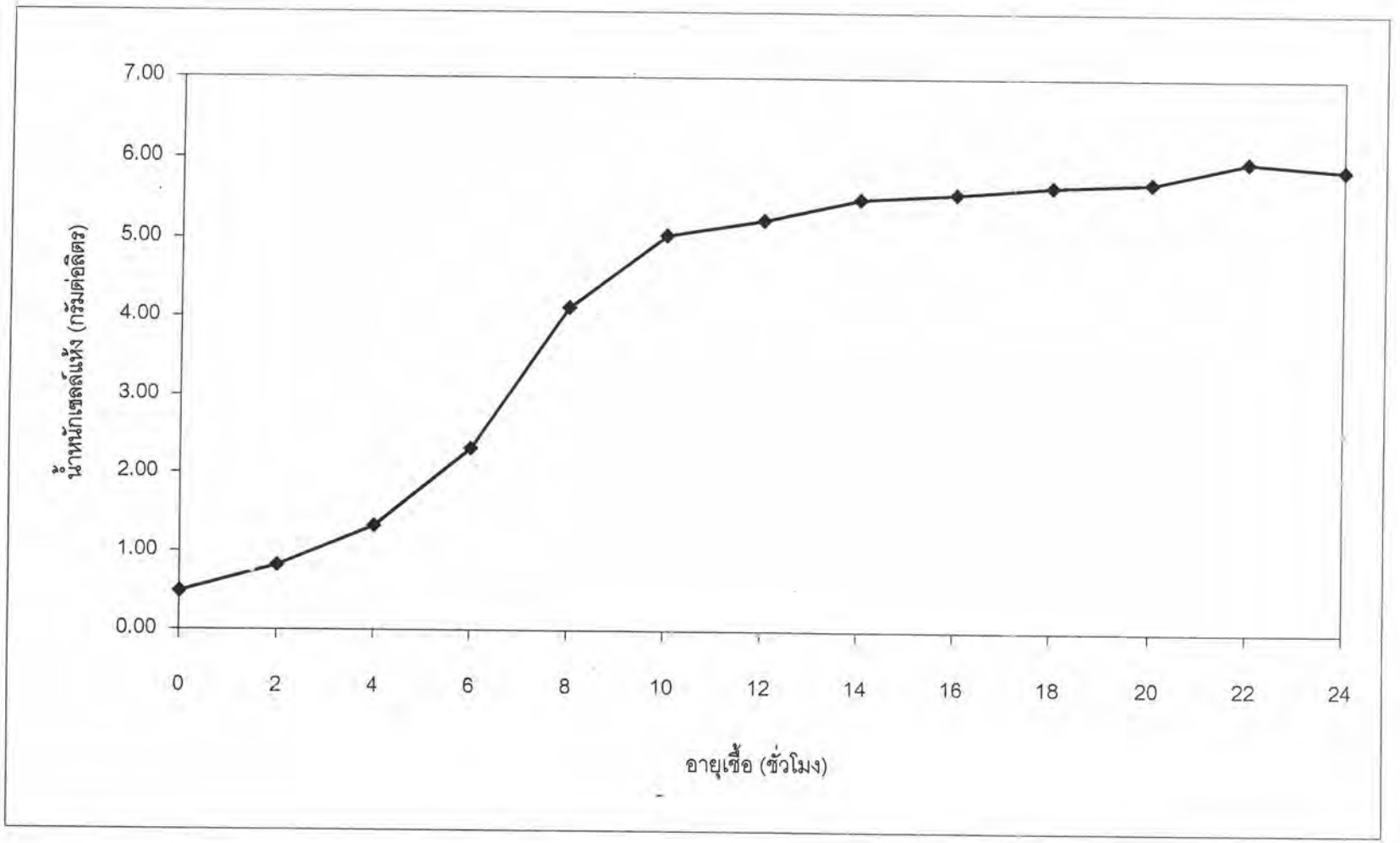
เลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SG1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก. 1.1) ตามวิธีเตรียมหัวเชื้อสำหรับการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเซลล์ในข้อ 2.4.1 ติดตามการเจริญของเชื้อทุก ๆ 2 ชั่วโมง โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.5.1 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1 พบว่า ยีสต์มีการเพิ่มปริมาณเซลล์ดีจนถึงชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปริมาณเซลล์ของยีสต์ก็คงที่ตลอดจนจบการทดลอง และพบว่าที่ชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือเท่ากับ 0.29 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 8 ชั่วโมง สำหรับเป็นหัวเชื้อในการหมักต่อไป

3.2 ผลของการเติมเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์ ต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์

ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ดั้งเดิม (ภาคผนวก ก. 2.2) จะเห็นว่ามีสารเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์ อยู่ในสูตรอาหารเป็นปริมาณที่น้อยมาก ประกอบกับในองค์ประกอบของกากน้ำตาลมีแร่ธาตุเหล่านี้ปะปนอยู่ปริมาณหนึ่ง การเติมสารเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์จึงไม่น่าจำเป็น ดังนั้นจึงทำการทดลองโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกมีการเติมสารเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ตามปรกติ อีกส่วนหนึ่งไม่มีการเติมสารเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ ถ่ายหัวเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้ออายุ 8 ชั่วโมง 10 % (ปริมาตร : ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ทั้ง 2 สูตรซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักแบบแบช (ข้อ 2.4.3) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญ (ข้อ 2.5.1) และการใช้น้ำตาลของยีสต์ (ข้อ 2.5.2) เปรียบเทียบกัน ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2.1, ตารางที่ 3.2.2 และรูปที่ 3.2 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ไม่มีการเติมสารเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์ มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.31 ต่อชั่วโมง ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ

ตารางที่ 3.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	
0	0.46	0.50	0.48+/-0.03	-
2	0.81	0.82	0.82+/-0.01	0.26
4	1.33	1.33	1.33+/-0.00	0.24
6	2.31	2.32	2.32+/-0.00	0.28
8	4.13	4.13	4.13+/-0.00	0.29
10	4.96	5.12	5.04+/-0.11	0.10
12	5.27	5.19	5.23+/-0.06	0.02
14	5.50	5.50	5.50+/-0.01	0.02
16	5.57	5.56	5.57+/-0.00	0.01
18	5.65	5.67	5.66+/-0.01	0.01
20	5.76	5.65	5.71+/-0.08	0.00
22	6.03	5.93	5.98+/-0.07	0.02
24	5.89	5.87	5.88+/-0.02	-0.01



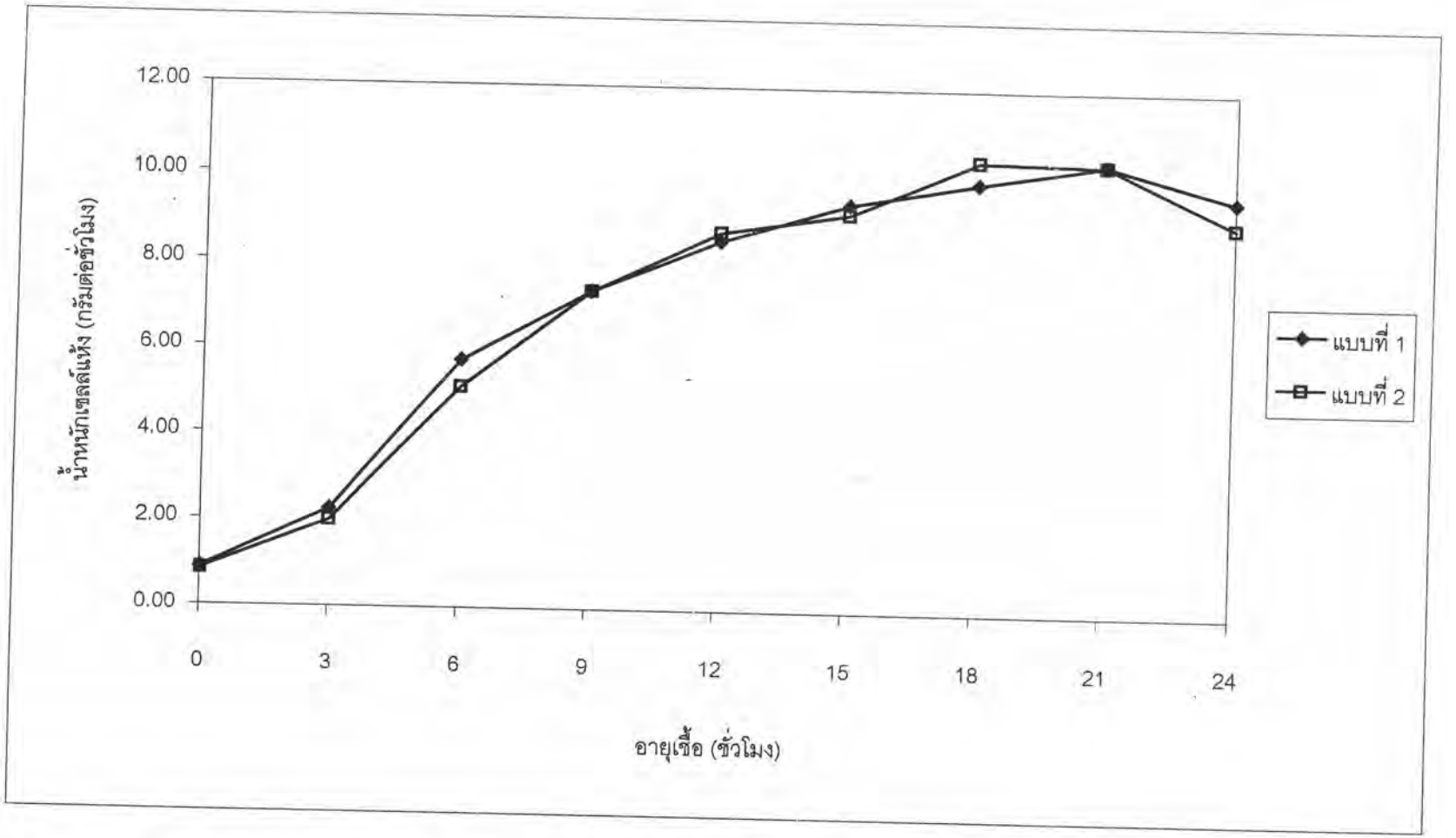
รูปที่ 3.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ตารางที่ 3.2.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และ ซิงค์คลอไรด์

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ(ต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
0	0.89	-	46.46	28.03	-
3	2.23	0.31	40.80	27.92	0.24
6	5.72	0.31	19.25	20.46	0.18
9	7.34	0.08	10.08	8.56	0.18
12	8.53	0.05	9.61	8.51	0.21
15	9.41	0.03	9.46	8.26	0.23
18	9.91	0.02	9.44	7.89	0.24
21	10.38	0.02	9.40	7.49	0.26
24	9.58	-0.03	9.18	7.40	0.23

ตารางที่ 3.2.2 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และ ซิงค์คลอไรด์

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ(ต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
0	0.85	-	45.26	28.08	-
3	1.98	0.28	38.03	27.71	0.16
6	5.09	0.31	23.92	20.64	0.20
9	7.35	0.12	11.17	8.77	0.19
12	8.72	0.06	10.59	8.47	0.23
15	9.17	0.02	10.10	7.96	0.24
18	10.42	0.04	10.08	7.92	0.27
21	10.37	0.00	9.93	7.38	0.27
24	8.99	-0.05	8.82	7.06	0.22



รูปที่ 3.2 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ไม่เติม (แบบที่ 1) และเติม (แบบที่ 2) เฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์

ผลิตเซลล์ที่มีการเติมสารเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์ มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 เช่นเดียวกัน และมีค่าเท่ากับ 0.31 ต่อชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าในอาหารทั้ง 2 สูตรให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไม่แตกต่างกัน ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไปจึงไม่มีการเติมสารเฟอริคคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต และซิงค์คลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในการหมักแบบขวดเขย่า

จากที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่าในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อต้องการให้อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์สูงจึงมีความจำเป็นที่จะทำให้แหล่งคาร์บอนไม่เป็นปัจจัยจำกัดในการเจริญ ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงน่าจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ด้วย แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่มากเกินไปก็มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์เช่นกัน ดังนั้นการทดลองในข้อนี้จึงได้ทำการหาความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดดีที่สุด โดยเลี้ยงเชื้อด้วยการหมักแบบขวดเขย่า (ข้อ 2.4.2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญ (ข้อ 2.5.1) และการใช้น้ำตาลของยีสต์ (ข้อ 2.5.2) เปรียบเทียบกัน ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3.1, ตารางที่ 3.3.2, ตารางที่ 3.3.3 และรูปที่ 3.3 พบว่าเมื่อให้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์จะมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.12 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ยีสต์ยังมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 เช่นเดิม แต่อัตราการเจริญจำเพาะมีค่าเป็น 0.16 และ 0.15 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญจำเพาะเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 20 และ 30 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่การหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงกว่าการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 30 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 9 ของการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป 0.17 และ 0.11 ตามลำดับ) ดังนั้นจึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.3.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 10 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบขวดเขย่า

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)			ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	
0	1.16	1.24	1.20+/-0.06	-	8.24	7.84	8.04+/-0.29	5.29	5.82	5.55+/-0.38	-
3	1.30	1.46	1.38+/-0.11	0.05	2.43	2.42	2.43+/-0.00	2.41	2.37	2.39+/-0.03	0.03
6	1.82	1.76	1.79+/-0.04	0.09	1.90	1.87	1.90+/-0.02	1.64	2.00	1.82+/-0.25	0.10
9	2.54	2.58	2.56+/-0.03	0.12	1.75	1.79	1.77+/-0.02	1.59	1.87	1.73+/-0.20	0.22
12	3.44	3.18	3.31+/-0.18	0.09	1.64	1.50	1.57+/-0.10	1.42	1.47	1.45+/-0.04	0.33

ตารางที่ 3.3.2 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 20 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบขวดเขย่า

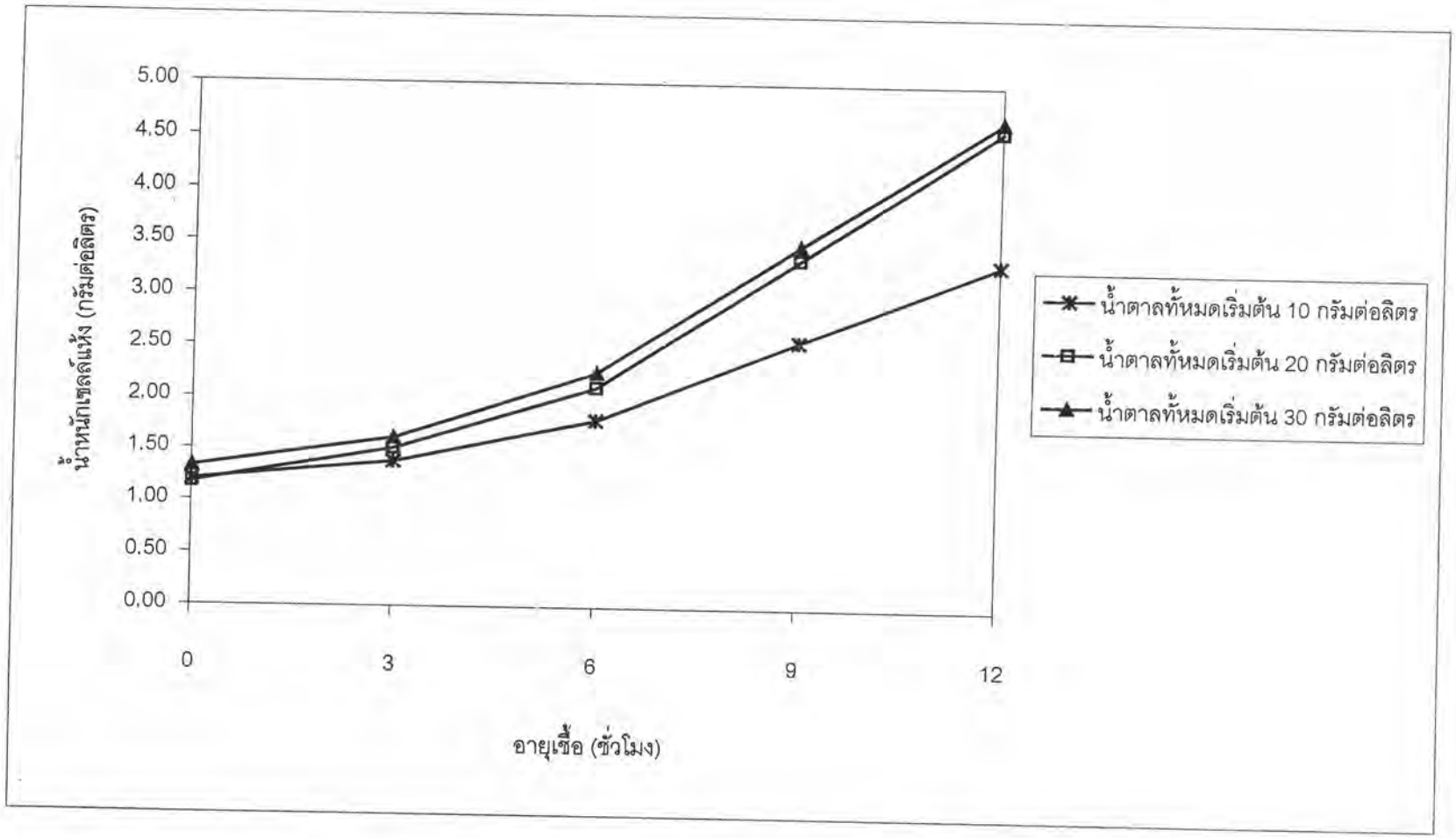
อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)			ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	
0	1.14	1.21	1.18+/-0.05	-	15.48	16.50	15.99+/-0.72	9.36	11.25	10.31+/-1.34	-
3	1.46	1.56	1.51+/-0.07	0.08	3.10	3.04	3.07+/-0.05	3.05	3.06	3.06+/-0.01	0.03
6	2.19	2.02	2.10+/-0.12	0.11	2.89	3.15	3.02+/-0.19	2.91	3.04	2.98+/-0.10	0.07
9	3.44	3.26	3.35+/-0.13	0.16	2.78	3.10	2.94+/-0.23	2.86	2.95	2.91+/-0.06	0.17

ตารางที่ 3.3.2 (ต่อ) การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 20 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบขวดเขย่า

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)			ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	
12	4.48	4.68	4.58+/-0.14	0.10	2.72	2.88	2.80+/-0.11	2.78	2.74	2.76+/-0.03	0.26

ตารางที่ 3.3.3 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 30 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบขวดเขย่า

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)			น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)			ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย	
0	1.44	1.21	1.33+/-0.16	-	24.22	24.12	24.17+/-0.07	13.59	13.68	13.63+/-0.06	-
3	1.58	1.64	1.61+/-0.04	0.06	5.70	5.70	5.70+/-0.00	1.20	5.06	3.13+/-2.73	0.02
6	2.24	2.26	2.25+/-0.01	0.11	5.39	5.42	5.41+/-0.02	5.35	5.38	5.36+/-0.02	0.05
9	3.52	3.44	3.48+/-0.06	0.15	5.02	4.85	4.93+/-0.12	5.00	4.84	4.92+/-0.11	0.11
12	5.14	4.20	4.67+/-0.66	0.10	5.02	4.62	4.82+/-0.28	3.92	3.94	3.93+/-0.02	0.17



รูป 3.3 เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีการแปรความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น เป็น 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร

3.4 การเจริญของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

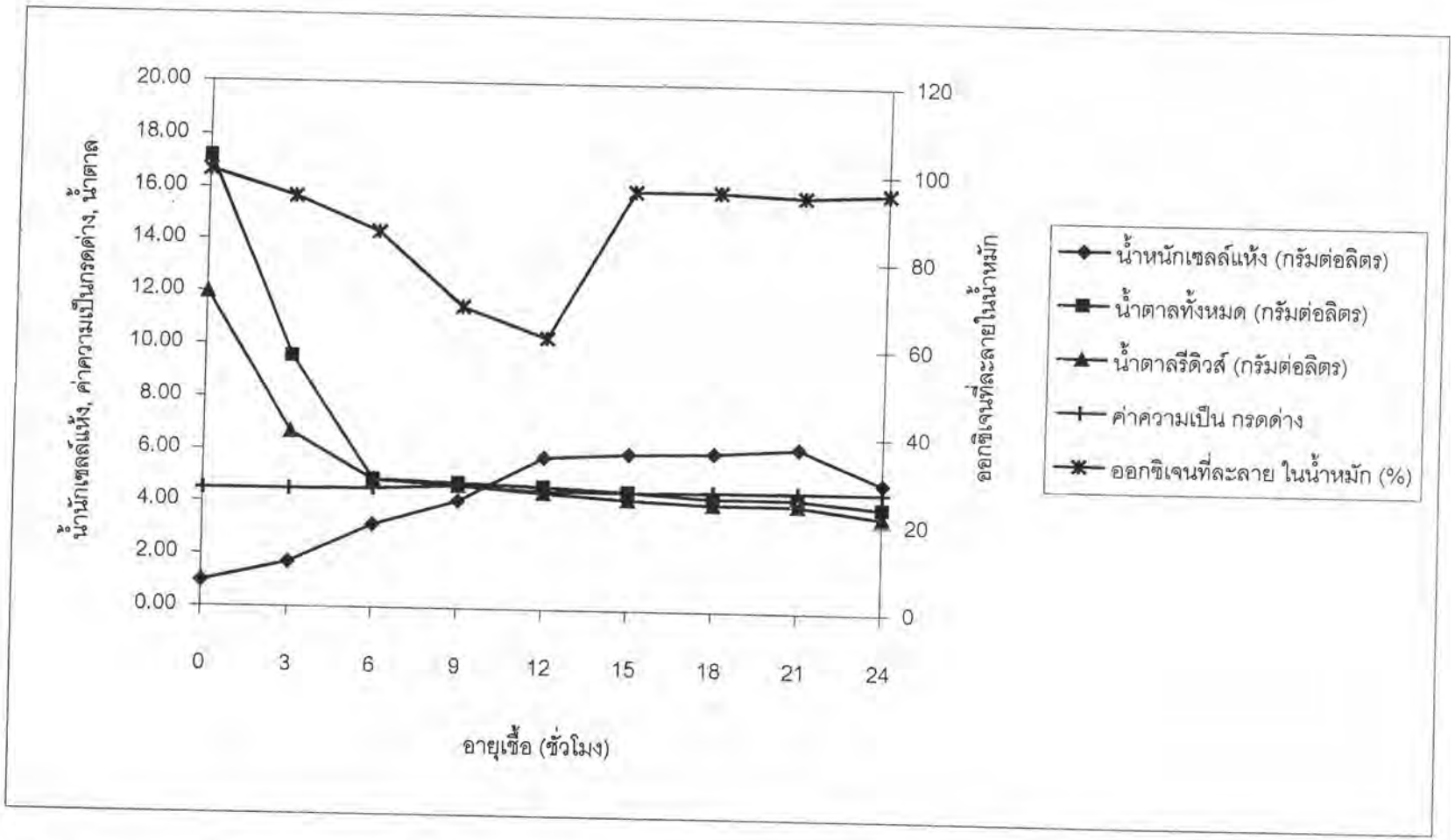
เมื่อทราบแล้วว่าควรใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์เป็น 20 กรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้จึงศึกษาการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง เพื่อต้องการทราบระยะเวลาในการหมักที่ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ข้อ 2.4.1) และถ่ายหัวเชื้อที่มีอายุ 8 ชั่วโมง 10 % (ปริมาตร:ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักแบบแบช (ข้อ 2.4.3) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญ (ข้อ 2.5.1) และการใช้น้ำตาลของยีสต์ (ข้อ 2.5.2) ผลการทดลองได้แสดงในตารางที่ 3.4 และ รูปที่ 3.4 พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญจึงลดลง และเป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 6 ของการหมักให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือ 0.21 และมีน้ำตาลทั้งหมดเหลือ 4.88 กรัมต่อลิตร ส่วนในชั่วโมงที่ 3 ของการหมักซึ่งเป็นการวิเคราะห์ก่อนหน้าที่การหมักจะให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ในน้ำหมักมีน้ำตาลทั้งหมดเหลือ 9.56 กรัมต่อลิตร ซึ่งภาวะนี้น่าจะส่งผลให้การหมักมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 6 ดังนั้นเพื่อต้องการรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ในการหมักแบบต่อเนื่องจึงเริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร (ใกล้เคียงกับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเหลือในชั่วโมงที่ 3) โดยเริ่มต้นเติมที่ชั่วโมงที่ 3 ของการหมัก ด้วยอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.195 ต่อชั่วโมง (เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ปั๊มสามารถควบคุมได้) สำหรับการทดลองต่อไป

3.5 ผลของอัตราการเจือจางต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองที่ 3.4 ทำให้ทราบว่าในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการหมักจะต้องมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเจือจาง 0.195 ต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในการหมักแบบแบช แต่ในการหมักแบบต่อเนื่องนี้น่าจะให้อัตราการเจริญจำเพาะที่สูงกว่าในการหมักแบบแบช ดังนั้นจึงทำการเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายหัวเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้ออายุ 8 ชั่วโมง 10 % (ปริมาตร:ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักแบบต่อเนื่อง (ข้อ 2.4.4) โดยชั่วโมงที่ 3 ของการหมักเริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มี

ตารางที่ 3.4 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 20 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบแบช ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

อายุเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป	ค่าความเป็นกรดด่าง	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	0.99	-	17.19	11.97	-	4.50	100
3	1.70	0.18	9.56	6.67	0.09	4.50	94
6	3.16	0.21	4.88	4.87	0.18	4.54	86
9	4.10	0.09	4.78	4.66	0.25	4.66	69
12	5.80	0.12	4.66	4.44	0.38	4.50	62
15	5.98	0.01	4.52	4.23	0.39	4.50	96
18	6.04	0.00	4.30	4.08	0.39	4.55	96
21	6.24	0.01	4.30	4.07	0.41	4.56	95
24	4.92	-0.08	4.02	3.65	0.30	4.56	96



รูปที่ 3.4 การเจริญของยีสต์ SG1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ) เป็น 20 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบแบช ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

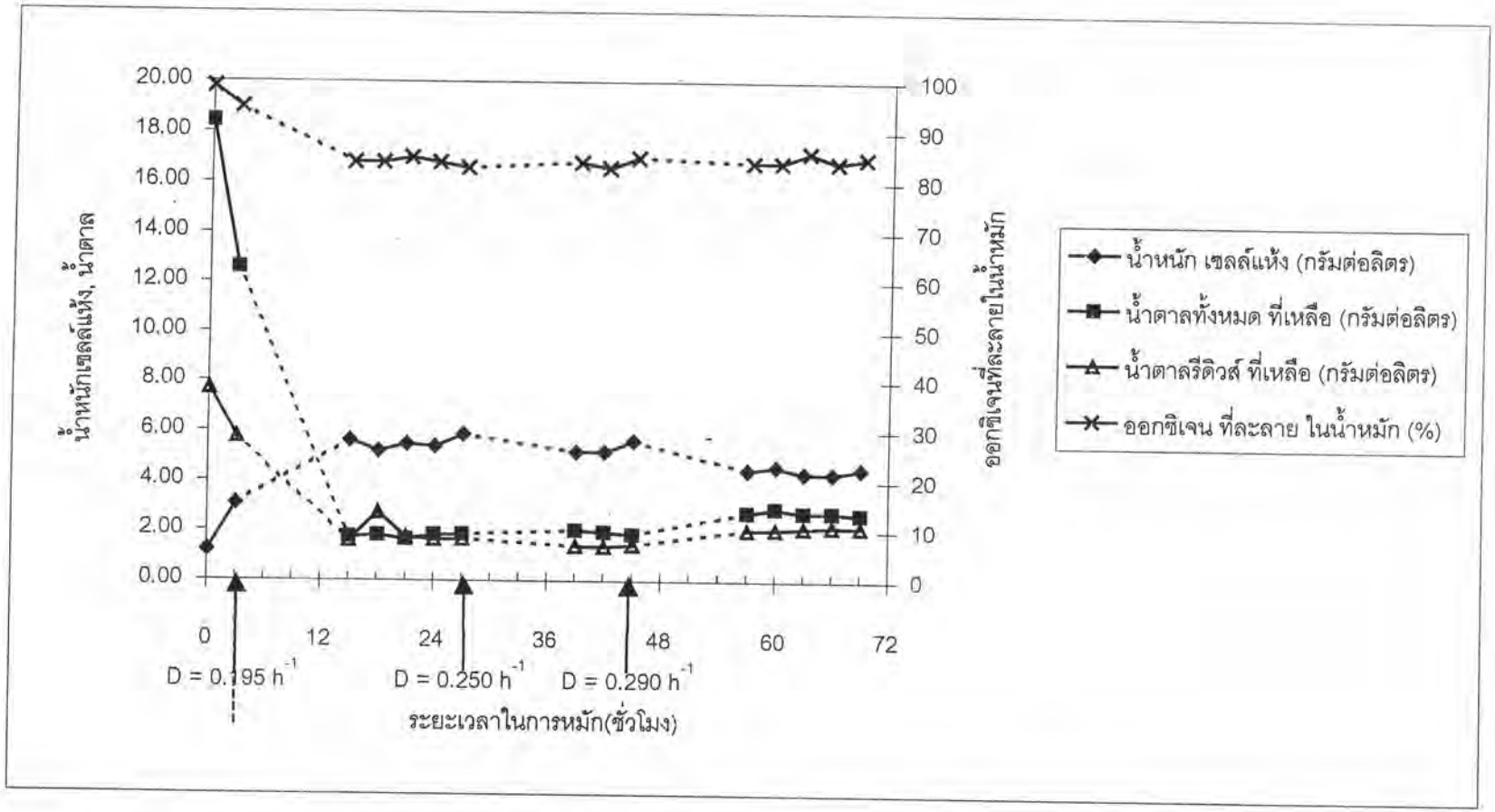
ความเข้มข้นของน้ำตาล10 กรัมต่อลิตร ลงในระบบ พร้อมทั้งปล่อยน้ำหมักให้ไหลออกจากระบบ โดยควบคุมอัตราการไหลเข้าและออกของสารต่อปริมาตรน้ำหมักให้เท่ากันด้วยอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.195 ต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญ (ข้อ 2.5.1) และการใช้น้ำตาลของยีสต์ (ข้อ 2.5.2) จนเชื้อเข้าสู่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ จากนั้นจึงเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.5.1 รูปที่ 3.5 และตารางที่ 3.5.2 ซึ่งแสดงเพียงน้ำหนักเซลล์แห้งและการใช้น้ำตาลของยีสต์ในภาวะคงที่สม่ำเสมอเท่านั้น จะเห็นได้ว่า ที่อัตราการเจือจางที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้งในน้ำหมักจะลดลง โดยที่อัตราการเจือจาง 0.195 ต่อชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย 5.52 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ที่อัตราการเจือจาง 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมงให้น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย 5.32 และ 4.45 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ต่อชั่วโมงแล้วปรากฏว่า ที่อัตราการเจือจาง 0.195 ให้น้ำหนักแห้งต่อชั่วโมงเท่ากับ 1.61 กรัมต่อชั่วโมง ในขณะที่ที่อัตราการเจือจาง 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงเท่ากับ 2.00 และ 1.93 กรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมงให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ต่อชั่วโมงสูงที่สุด ส่วนผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปที่อัตราการเจือจาง 0.195, 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.67, 0.66 และ 0.62 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่ต่างกันมากในทั้ง 3 อัตราการเจือจาง ดังนั้นจึงเลือกอัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง เป็นอัตราการเจือจางสำหรับการทดลองต่อไป

3.6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบการหมักแบบต่อเนื่องต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250ต่อชั่วโมง

จากผลการทดลองที่ผ่านมาทำให้ทราบว่า ในการหมักแบบต่อเนื่องโดยมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร ลงในระบบ พร้อมทั้งปล่อยน้ำหมักให้ไหลออกจากระบบ ด้วยอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.250 ต่อชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงสูงที่สุด 2.00 กรัมต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่น้อยมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ใช้เติมลงในระบบเพื่อให้ได้น้ำหนักเซลล์ต่อชั่วโมงเพิ่มขึ้น โดยถ่ายหัวเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้ออายุ 8 ชั่วโมง 10 % (ปริมาตร:ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักแบบต่อเนื่อง (ข้อ 2.4.4) โดยชั่วโมงที่ 3 ของการหมักจึงเริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร ลงในระบบ พร้อมทั้งปล่อยน้ำหมักให้ไหลออกจากระบบ โดยควบคุมอัตราการไหลเข้าและออกของสารต่อปริมาตรน้ำหมักให้เท่ากันด้วยอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.250 ต่อชั่วโมง รอจนเชื้อเข้าสู่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ (ประมาณ 12 ชั่วโมง) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญ (ข้อ 2.5.1)

ตารางที่ 3.5.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.195, 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	-	1.21	18.41	7.71	99
3	-	3.07	12.57	5.77	95
15	0.195	5.62	1.75	1.61	84
18	0.195	5.20	1.82	2.72	84
21	0.195	5.49	1.67	1.74	85
24	0.195	5.40	1.83	1.66	84
27	0.195	5.89	1.86	1.68	83
39	0.250	5.17	2.04	1.41	84
42	0.250	5.17	1.96	1.38	83
45	0.250	5.63	1.87	1.44	85
57	0.290	4.45	2.76	2.05	84
60	0.290	4.61	2.91	2.08	84
63	0.290	4.35	2.75	2.15	86
66	0.290	4.32	2.76	2.20	84
69	0.290	4.51	2.69	2.18	85



รูปที่ 3.5 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.195, 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง (▲ คือเวลาเริ่มเปลี่ยนอัตราการเจือจาง และ ▲ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.5.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล10 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.195, 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง

อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
0.195	5.52+/-0.26	1.61	1.85+/-0.08	0.67
0.250	5.32+/-0.26	2.00	1.96+/-0.08	0.66
0.290	4.45+/-0.12	1.93	2.79+/-0.08	0.62

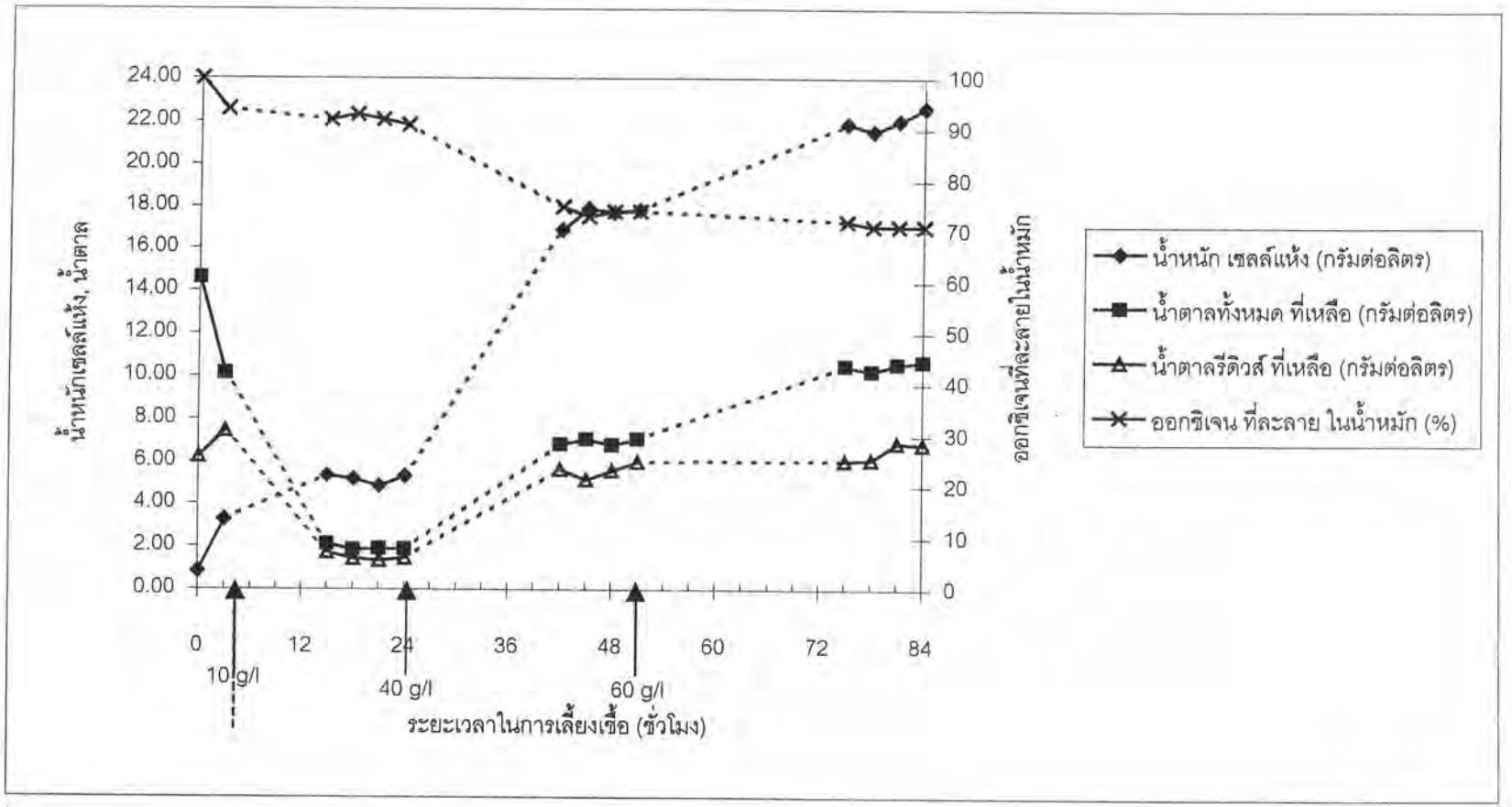
และการใช้น้ำตาลของยีสต์ (ข้อ 2.5.2) จากนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วทำการทดลองเช่นเดิม ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.6.1และรูปที่ 3.6 สำหรับค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์ที่ได้ การใช้น้ำตาล และค่าผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป แสดงในตารงที่ 3.6.2 เมื่อเปรียบเทียบค่าผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอจะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยเท่ากับ 5.16, 17.59 และ 22.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 0.64, 0.53 และ 0.44 จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาตรได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 40 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร มีผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาตรเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 10 กรัมต่อลิตร เป็น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลจะลดลงประมาณ 0.1 (จาก 0.64 เป็น 0.53) ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 40 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเพียง 20 กรัมต่อลิตร แต่ส่งผลให้ผลผลิตต่อเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลลดลงประมาณ 0.1 (จาก 0.53 เป็น 0.44) เช่นกัน ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร จึงเหมาะที่จะใช้เป็นสูตรอาหารสำหรับเติมเข้าสู่ระบบในขั้นต่อไป

3.7 ผลของอัตราการเจือจางต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่องที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองที่ 3.6 ทำให้ทราบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสำหรับเติมเข้าสู่ระบบควรมีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และจากผลการทดลองที่ 3.2 พบว่าเมื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 6 ของการหมักเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือ 0.31 ต่อชั่วโมง และในชั่วโมงที่ 3 ของการหมัก ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ก่อนหน้าที่การหมักจะให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ในน้ำหมักมีน้ำตาลทั้งหมดเหลือ 40.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งภาวะนี้น่าจะส่งผลให้การหมักมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 6 ดังนั้นการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อในระบบไม่ต่อเนื่องจนชั่วโมงที่ 3 ของการหมัก จึงเริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ระบบ น่าจะส่งผลให้สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดไว้ได้ แต่จากภาวะที่ใช้ในการทดลองที่ 3.6 ได้ใช้อัตราการเจือจางเพียง 0.25 ในขณะที่จากผลการทดลองที่ 3.2 อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของเชื้อสูงถึง

ตารางที่ 3.6.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อแปรการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 10, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เติม (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	-	0.86	14.60	6.22	100
3	-	3.28	10.12	7.43	94
15	10	5.34	2.10	1.74	92
18	10	5.16	1.83	1.43	93
21	10	4.82	1.91	1.35	92
24	10	5.31	1.86	1.45	91
42	40	16.90	6.81	5.62	75
45	40	17.91	7.06	5.14	73
48	40	17.71	6.78	5.58	74
51	40	17.83	7.05	5.98	74
75	60	21.89	10.48	6.05	72
78	60	21.52	10.24	6.09	71
81	60	22.01	10.56	6.89	71
84	60	22.63	10.68	6.82	71



รูปที่ 3.6 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อแปรการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 10, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง (↑คือเวลาเริ่มเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมเข้าสู่ระบบ และ ↑คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.6.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 10, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

น้ำตาลทั้งหมดที่เติม (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
10	5.16+/-0.24	1.93	1.92+/-0.12	0.64
40	17.59+/-0.47	6.60	6.92+/-0.15	0.53
60	22.01+/-0.46	8.25	10.49+/-0.19	0.44

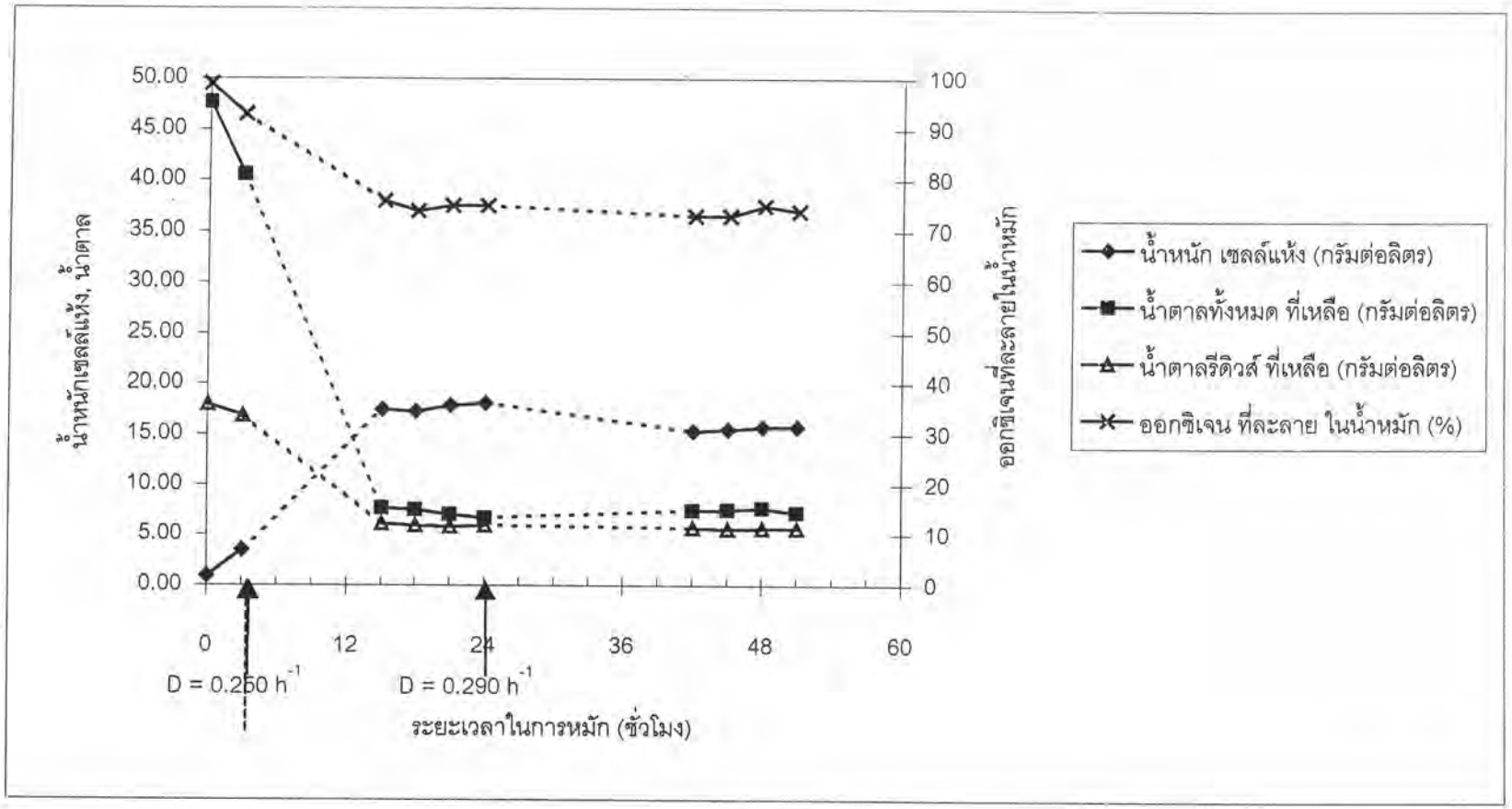
0.31 ต่อชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทดลองเพิ่มอัตราการเจือจางจาก 0.250 ต่อชั่วโมง เป็น 0.290 ต่อชั่วโมง (เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับอัตราการเจริญจำเพาะ 0.31 ต่อชั่วโมงที่ปั๊มสามารถควบคุมได้) โดยเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ให้ผลในหัวข้อ 3.6 แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น และเริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ระบบ ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการหมัก เลี้ยงเชื้อด้วยระบบต่อเนื่อง (ข้อ 2.4.4) โดยควบคุมอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.250 ต่อชั่วโมง จนเชื้อเข้าสู่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญ (ข้อ 2.5.1) และการใช้น้ำตาลของยีสต์ (ข้อ 2.5.2) จากนั้นจึงเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.290 ต่อชั่วโมง แล้วทดลองเช่นเดิม ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.7.1, รูปที่ 3.7 และตารางที่ 3.7.2 จะเห็นได้ว่าที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง 6.62 กรัมต่อชั่วโมง และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเป็น 0.53 ในขณะที่อัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง 6.78 กรัมต่อชั่วโมง และผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ได้เป็น 0.48 ถึงแม้ว่าอัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่วโมง จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงสูงกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงที่ได้จากอัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง แต่ก็เป็นเพียงปริมาณที่เล็กน้อย ในขณะที่ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปที่ได้จากอัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง สูงกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่วโมง และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาตรที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมงให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.65 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 15.59 กรัมต่อลิตร นั่นแสดงว่าถ้าต้องการเซลล์ปริมาณเท่ากัน ที่อัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่วโมงต้องใช้น้ำหมักปริมาตรมากกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.250 ซึ่งก็จะเป็นการสิ้นเปลืองกว่า ดังนั้นจึงเลือกอัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง เป็นอัตราการเจือจางสำหรับการทดลองต่อไป

3.8 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง

จากที่ได้กล่าวมาแล้วว่า ในการหมัก การกวนนอกจากจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อกับเซลล์คลุกเคล้าสัมผัสกันได้ดียิ่งขึ้นแล้ว การกวนยังเป็นการช่วยให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนระหว่างฟองอากาศที่ให้เข้าสู่ระบบกับน้ำหมักได้ดีขึ้น แต่การกวนต้องอาศัยพลังงานไฟฟ้าซึ่งเป็นการสิ้นเปลือง และการกวนที่แรงเกินไปทำให้เซลล์แตกได้ หรือส่งผลให้เกิดฟองที่ผิวหน้าของน้ำหมักมาก ดังนั้นการทดลองนี้จึงพยายามหาอัตราการกวนที่ต่ำที่สุดที่สามารถให้ผลผลิตเซลล์สูง โดยเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ให้ผลในหัวข้อ 3.7 และควบคุมอัตราการกวนที่ 800 รอบต่อนาที จนเชื้อเข้าสู่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ จึงเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญ (ข้อ 2.5.1) และการใช้น้ำตาลของยีสต์ (ข้อ 2.5.2) จากนั้นจึงลดอัตราการกวนเป็น 600 และ 700 รอบต่อนาที ตามลำดับ จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 3.8.1, รูปที่ 3.8 และตารางที่

ตารางที่ 3.7.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	-	0.93	47.66	17.95	99
3	-	3.49	40.56	16.87	93
15	0.250	17.44	7.69	6.15	76
18	0.250	17.26	7.52	5.94	74
21	0.250	17.83	7.06	5.84	75
24	0.250	18.08	6.74	5.96	75
42	0.290	15.37	7.46	5.74	73
45	0.290	15.49	7.52	5.60	73
48	0.290	15.74	7.67	5.68	75
51	0.290	15.74	7.24	5.67	74



รูปที่ 3.7 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง (↑ คือเวลาเริ่มเปลี่ยนอัตราการเจือจาง และ ↑ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.7.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง

อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
0.250	17.65+/-0.37	6.62	7.25+/-0.43	0.54
0.290	15.59+/-0.18	6.78	7.47+/-0.18	0.48

3.8.2 พบว่า เมื่ออัตราการกวนลดลงออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักลดลงด้วย แต่น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ไม่แปรตามปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก โดยที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักวัดได้ประมาณ 75 % น้ำหนักเซลล์แห้งวัดได้ 15.99 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อลดอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักวัดได้ลดลงเหลือประมาณ 59 % ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งวัดได้ 16.36 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาทีมากนัก ในขณะที่เมื่อเปลี่ยนอัตราการกวนเป็น 700 รอบต่อนาที ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักวัดได้ 71 % ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งวัดได้ถึง 19.10 กรัมต่อลิตร และยังให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงถึง 0.59 ในขณะที่ที่อัตราการกวน 800 และ 600 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเป็น 0.47 และ 0.48 ตามลำดับ จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตเซลล์สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกอัตราการกวนนี้สำหรับการทดลองต่อไป

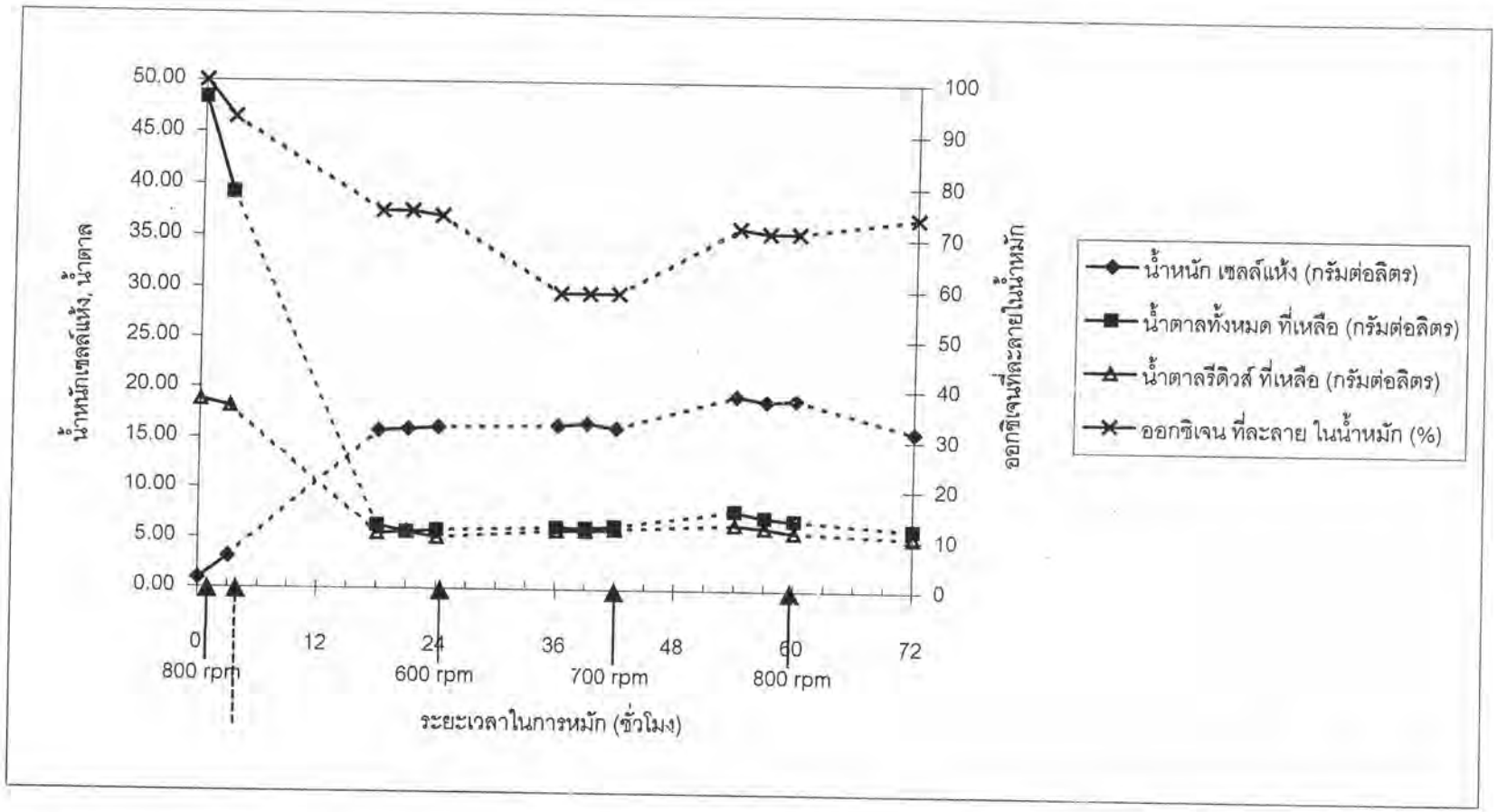
นอกจากนี้เมื่อเปลี่ยนอัตราการกวนจาก 700 รอบต่อนาที กลับมาเป็น 800 รอบต่อนาที น้ำหนักเซลล์แห้งที่วัดได้มีค่า 15.86 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองในตอนต้น จึงแสดงให้เห็นว่าเวลาไม่มีผลต่อคุณสมบัติในการเจริญการหมักแบบต่อเนื่อง

3.9 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง

เป็นที่ทราบกันแล้วว่าออกซิเจนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์ ดังนั้นการให้อากาศแก่ระบบการหมักยีสต์เพื่อต้องการเซลล์จึงเป็นสิ่งจำเป็น แต่การให้อากาศที่มากเกินความต้องการของยีสต์จะเป็นการสิ้นเปลืองโดยเปล่าประโยชน์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงพยายามหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ โดยเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ให้ผลในหัวข้อ 3.8 และควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 3 vvm จนเชื้อเข้าสู่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ จึงเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญ (ข้อ 2.5.1) และการใช้น้ำตาลของยีสต์ (ข้อ 2.5.2) จากนั้นจึงลดอัตราการให้อากาศที่ 2 vvm จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 3.9.1, รูปที่ 3.9 และตารางที่ 3 .9.2 พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 3 vvm ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 21.01 กรัมต่อลิตร และมีผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป 0.63 ในขณะที่ที่อัตราการให้อากาศ 2 vvm ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 19.77 กรัมต่อลิตร และมีผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป 0.60 จะเห็นได้ว่าที่อัตราการให้อากาศ 3 vvm ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง รวมทั้งผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงกว่าที่อัตราการให้อากาศที่ 2 vvm ดังนั้นจึงเลือกอัตราการให้อากาศ 3 vvm สำหรับใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

ตารางที่ 3.8.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการกวนเป็น 800, 600 และ 700 รอบต่อนาที

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	800	0.91	48.33	18.75	100
3	800	3.07	39.18	18.12	93
18	800	15.82	6.29	5.50	75
21	800	15.99	5.64	5.66	75
24	800	16.16	5.82	5.10	74
36	600	16.36	6.19	5.86	59
39	600	16.60	6.11	5.86	59
42	600	16.11	6.31	5.99	59
54	700	19.38	7.90	6.53	72
57	700	18.87	7.24	6.23	71
60	700	19.06	7.00	5.80	71
72	800	15.86	6.11	5.33	74



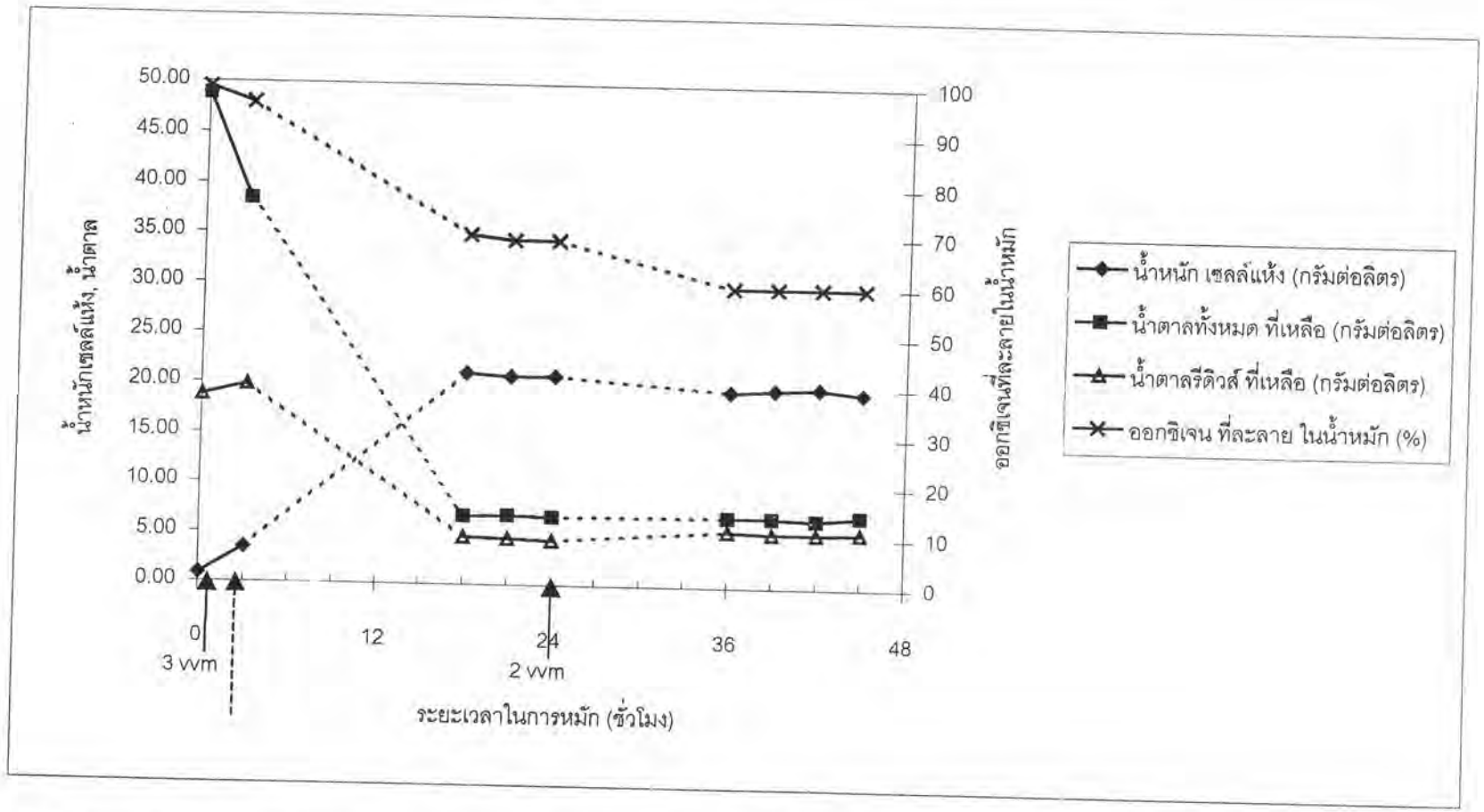
รูปที่ 3.8 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการกวนเป็น 800, 600 และ 700 รอบต่อนาที (▲คือเวลาเริ่มเปลี่ยนอัตราการกวน และ ▲ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.8.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการกวนเป็น 800, 600 และ 700 รอบต่อนาที

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
800	15.99+/-0.17	5.99	5.92+/-0.34	0.47
600	16.36+/-0.25	6.13	6.21+/-0.10	0.48
700	19.10+/-0.26	7.16	7.38+/-0.47	0.59

ตารางที่ 3.9.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการให้อากาศเป็น 3 และ 2 vvm

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	3	0.85	48.78	18.75	99
3	3	3.49	38.46	19.86	96
18	3	21.15	6.81	4.73	70
21	3	20.91	6.91	4.64	69
24	3	20.96	6.80	4.47	69
36	2	19.63	7.01	5.62	60
39	2	19.84	6.99	5.42	60
42	2	20.01	6.82	5.43	60
45	2	19.58	7.22	5.57	60



รูปที่ 3.9 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการให้อากาศเป็น 3 และ 2 vvm (↑คือเวลาเริ่มเปลี่ยนอัตราการให้อากาศ และ ↑คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.9.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอัตราการให้อากาศเป็น 3 และ 2 vvm

อัตราการให้อากาศ (vvm)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
3	21.01+/-0.13	7.88	6.84+/-0.06	0.63
2	19.77+/-0.20	7.41	7.01+/-0.17	0.60

3.10 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง

จากที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 ว่าสภาพความเป็นกรดด่างของน้ำหมักมีผลต่อการเจริญของยีสต์ ในการทดลองนี้จึงพยายามหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์มากที่สุด นอกจากนี้ในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างจะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนั้นเพื่อให้เป็นการคุ้มทุนจึงมีการคำนวณผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปที่ความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ประกอบการพิจารณาด้วย โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ให้ผลในหัวข้อ 3.9 แต่ทำการแปรค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5, 4.0 และ 5.0 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.10.1, รูปที่ 3.10 และตารางที่ 3.10.2 จะพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 จะให้น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงที่สุดคือ 20.66 กรัมต่อลิตร และ 1.22 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 และ 5.0 ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.17 และ 16.93 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และให้ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อโซเดียมไฮ ดรอกไซด์ที่ใช้ไป 1.21 และ 0.91 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 เป็นค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้ควบคุมในการทดลองต่อ ๆ ไป

3.11 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง

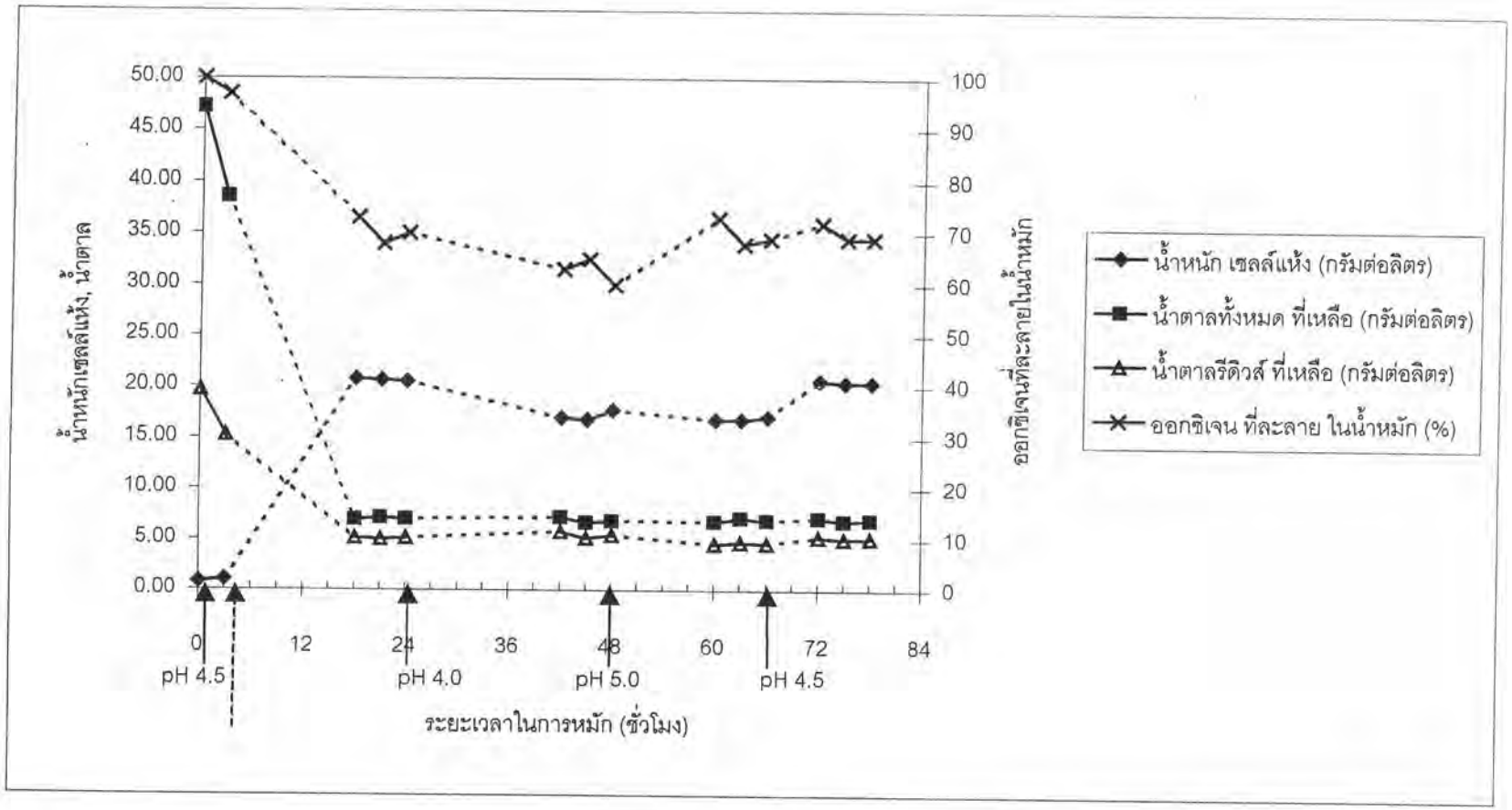
จากที่กล่าวมาแล้วในบทนำว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของยีสต์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงพยายามหาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ที่สุด นอกจากนี้ในการเจริญของยีสต์ยังทำให้เกิดความร้อนขึ้นในระบบ ดังนั้นในการควบคุมอุณหภูมิของระบบจึงจำเป็นต้องใช้การหล่อเย็น โดยถ้ายิ่งต้องการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับต่ำก็ยิ่งจะต้องสิ้นเปลืองพลังงานในการหล่อเย็นสูง ซึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเซลล์ยีสต์จะควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นถ้าสามารถเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ควบคุมโดยไม่ทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง ก็จะเป็นการลดต้นทุนในการหล่อเย็นได้ ในการทดลองนี้จึงทำการแปรอุณหภูมิของระบบจาก 30 องศาเซลเซียส ไปเป็น 33 และ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ ผลการทดลองได้แสดงในตารางที่ 3.11.1, รูปที่ 3.11 และตารางที่ 3.11.2 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 19.72 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปคือ 0.59 ในขณะที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 33 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีประมาณ 23.08 กรัมต่อลิตร และผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปคือ 0.69 ซึ่งสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิกลับมาเป็น 30 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์แห้งก็กลับมามีค่า 19.27 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับในตอนต้น จากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนกระทั่งมาถึง 35 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์แห้งกลับไม่เพิ่มขึ้นคือมีค่าอยู่ประมาณ 19.27 กรัมต่อลิตร และมีผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปเป็น 0.59 จากการทดลองนี้จึงเห็นได้ว่าอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ให้น้ำหนัก

ตารางที่ 3.10.1 การเจริญของยีสต์ SG1 และการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เป็น 4.5, 4.0 และ 5.0

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)	โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปใน 3 ชั่วโมง (มิลลิลิตร)
0	4.5	0.82	47.19	19.70	100	
3	4.5	1.03	38.58	15.26	97	
18	4.5	20.78	6.96	5.16	73	19
21	4.5	20.66	7.16	5.04	68	19
24	4.5	20.54	7.02	5.14	70	19
42	4.0	16.97	7.22	5.78	63	16
45	4.0	16.85	6.69	5.16	65	16
48	4.0	17.71	6.85	5.46	60	16
60	5.0	16.85	6.83	4.57	73	21
63	5.0	16.85	7.16	4.75	68	21
66	5.0	17.09	6.93	4.65	69	21

ตารางที่ 3.10.1 (ต่อ) การเจริญของยีสต์ SG1 และการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เป็น 4.5, 4.0 และ 5.0

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)	โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปใน 3 ชั่วโมง (มิลลิลิตร)
72	4.5	20.66	7.17	5.24	72	19
75	4.5	20.41	6.85	5.07	69	19
78	4.5	20.41	7.01	5.14	69	19



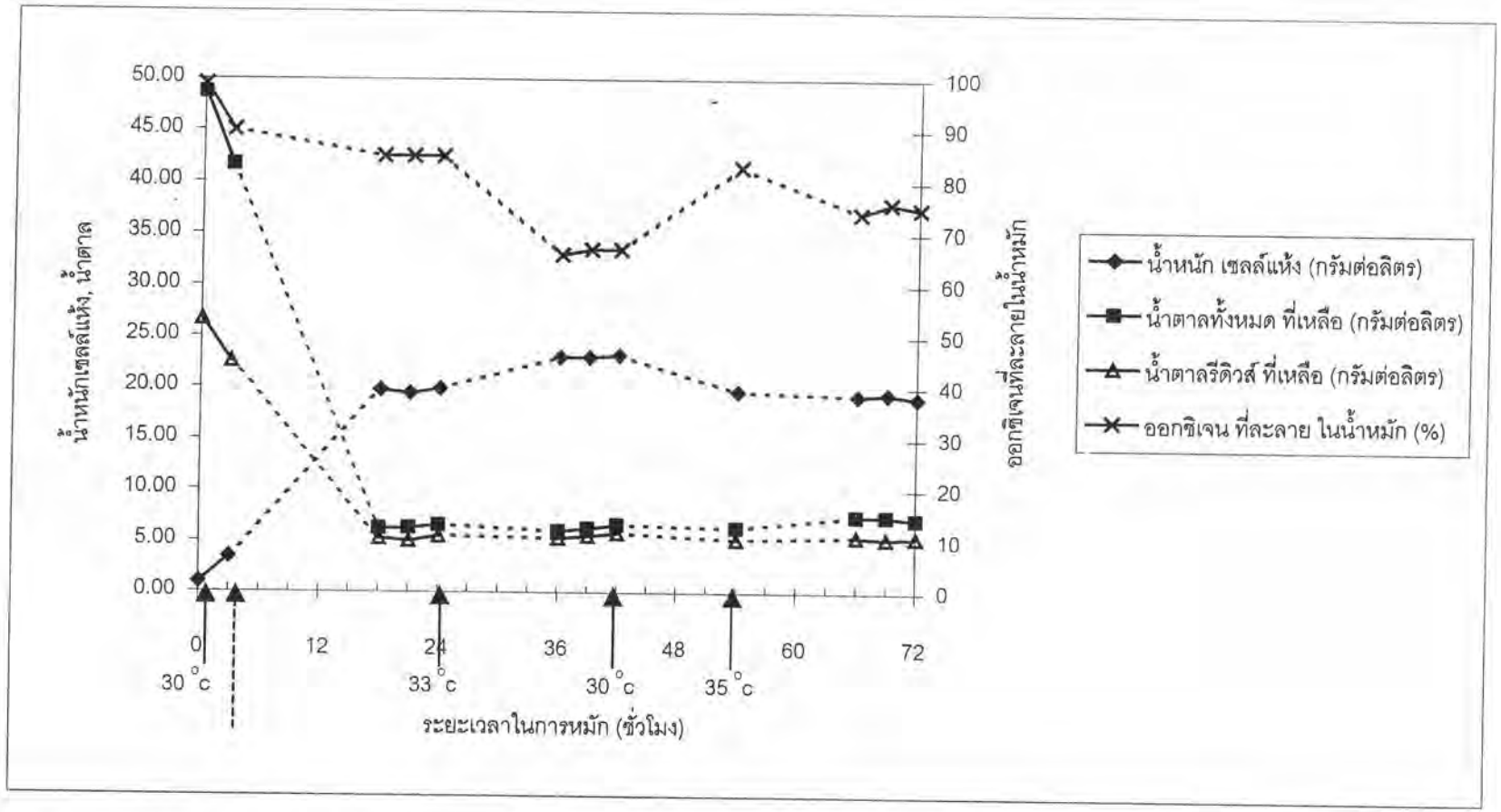
รูปที่ 3.10 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5, 4.0 และ 5.0 (↑ คือเวลาเริ่มเปลี่ยนการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง และ ↑ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.10.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญ การใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 และการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5, 4.0 และ 5.0

ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไป (กรัมต่อมิลลิลิตร)
4.5	20.66+/-0.12	7.75	7.05+/-0.10	0.63	1.22
4.0	17.17+/-0.47	6.44	6.92+/-0.27	0.52	1.21
5.0	16.93+/-0.14	6.35	6.97+/-0.17	0.51	0.91

ตารางที่ 3.11.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอุณหภูมิเป็น 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	30	1.00	48.71	26.68	99
3	30	3.42	41.62	22.55	90
18	30	19.80	6.26	5.28	85
21	30	19.43	6.32	5.05	85
24	30	19.92	6.55	5.48	85
36	33	23.00	5.99	5.30	66
39	33	23.00	6.32	5.52	67
42	33	23.24	6.65	5.86	67
54	30	19.68	6.35	5.22	83
66	35	19.31	7.49	5.50	74
69	35	19.43	7.52	5.30	76
72	35	19.06	7.20	5.46	75



รูปที่ 3.11 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตรที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอุณหภูมิเป็น 30, 33 และ 3 5 องศาเซลเซียส (↑ คือเวลาเริ่มเปลี่ยนอุณหภูมิ และ↑ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.11.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล40 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง โดยแปรอุณหภูมิเป็น 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
30	19.72+/-0.26	7.39	6.38+/-0.16	0.59
33	23.08+/-0.14	8.65	6.32+/-0.33	0.69
35	19.27+/-0.19	7.22	7.41+/-0.17	0.59

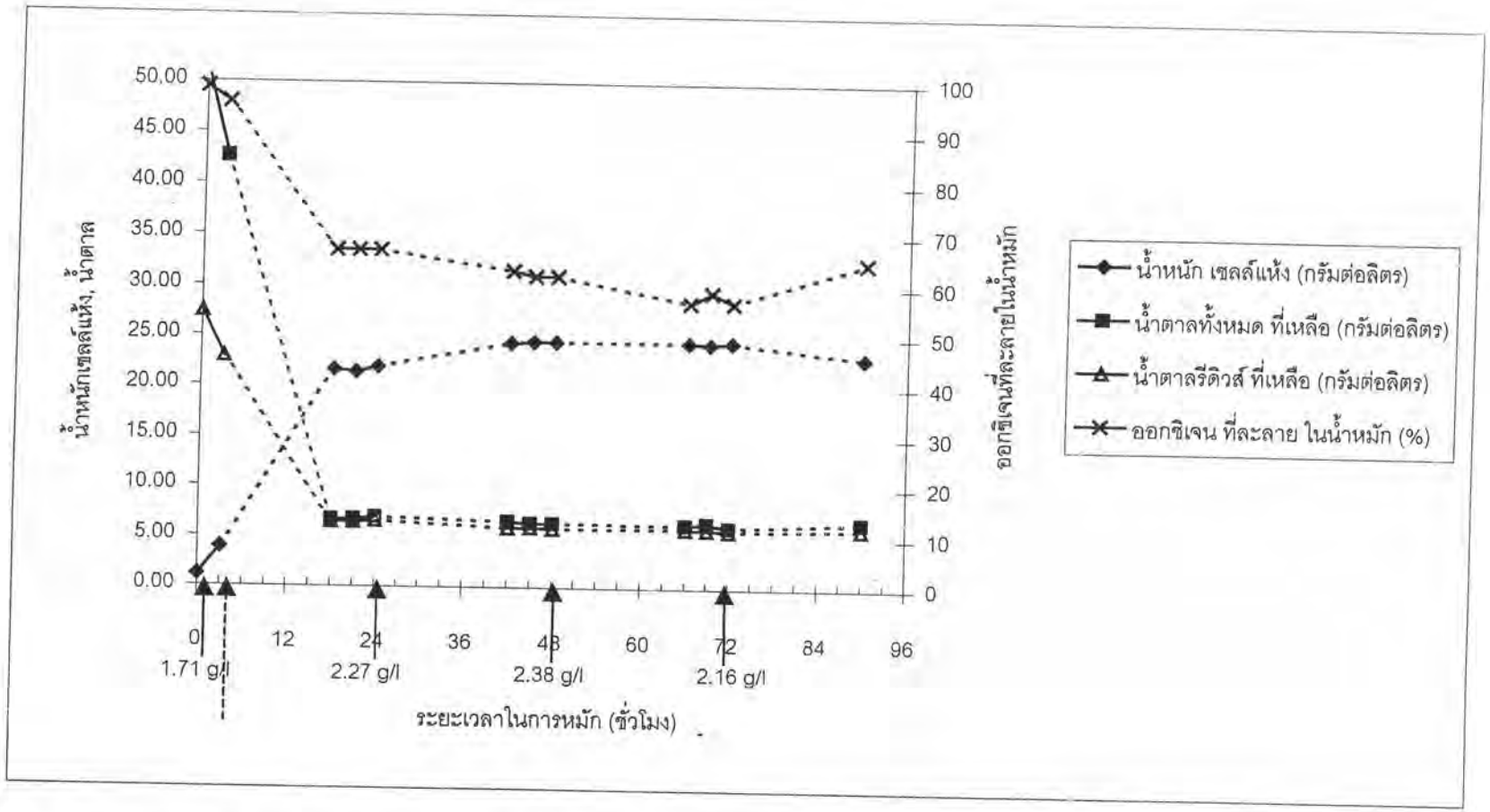
เซลล์แห้งมากที่สุด และให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงที่สุดเช่นกัน ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิสำหรับระบบในการทดลองต่อ ๆ ไป

3.12 ผลของไนโตรเจนต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง

จากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมา (ภาคผนวก ก. 2.1) เมื่อคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเห็นได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์มีไนโตรเจน 1.71 กรัมต่อลิตร (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ง. 5) และจากผลการทดลองที่ผ่านมาปริมาณเซลล์ที่เคยผลิตได้มากที่สุดคือ 8.65 กรัมต่อชั่วโมง (จากผลการทดลองที่ 3.11) โดยเมื่อคำนวณการหาปริมาณไนโตรเจนที่ต้องการใช้ในการผลิตเซลล์ปริมาณนี้จะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 8.5 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.4 กรัมต่อลิตร (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ง. 6) เมื่อคำนวณเป็นปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 2.27 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการเปรียบเทียบการใช้สูตรอาหารเดิม (ปริมาณไนโตรเจน 1.71 กรัมต่อลิตร) กับสูตรอาหารใหม่ (ปริมาณไนโตรเจน 2.27 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.12.1, รูป 3.12 และตารางที่ 3.12.2 พบว่าเมื่อใช้สูตรอาหารเดิมจะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 21.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงได้ 8.12 กรัมต่อชั่วโมง และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปมีค่า 0.65 แต่ในสูตรอาหารใหม่จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งถึง 24.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงได้ถึง 9.16 กรัมต่อชั่วโมง และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปมีค่าถึง 0.73 ซึ่งค่าเหล่านี้สูงกว่าในสูตรอาหารเดิมมาก จากนั้นลองเพิ่มแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 9.0 กรัมต่อลิตร และเพิ่มแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 2.5 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจน 2.38 กรัมต่อลิตร) ปรากฏว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 24.45 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่เพิ่มขึ้นจากเดิม แต่เมื่อลดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 8 กรัมต่อลิตร และลดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 2.3 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจน 2.16 กรัมต่อลิตร) ปรากฏว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าลดลงคือมีค่า 23.00 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญในขณะที่ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 2.27 กรัมต่อลิตร นั่นคือต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 8.5 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.4 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3.12.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และแปรปริมาณไนโตรเจนเป็น 1.71, 2.27, 2.38 และ 2.16 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	1.71	1.14	51.19	27.39	99
3	1.71	3.91	42.65	22.87	96
18	1.71	21.64	6.67	6.45	67
21	1.71	21.40	6.75	6.44	67
24	1.71	21.89	6.91	6.59	67
42	2.27	24.35	6.59	5.96	63
45	2.27	24.47	6.39	6.00	62
48	2.27	24.47	6.39	5.89	62
66	2.38	24.49	6.37	5.98	57
69	2.38	24.35	6.53	5.87	59
72	2.38	24.52	6.14	5.79	57
90	2.16	23.00	6.62	5.99	65



รูปที่ 3.12 การเจริญของยีสต์ SG ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และแปรปริมาณไนโตรเจนเป็น 1.71, 2.27, 2.38 และ 2.16 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง (↑คือเวลาเริ่มเปลี่ยนปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ↑ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.12.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และแปรปริมาณไนโตรเจนเป็น 1.71, 2.27, 2.38 และ 2.16 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

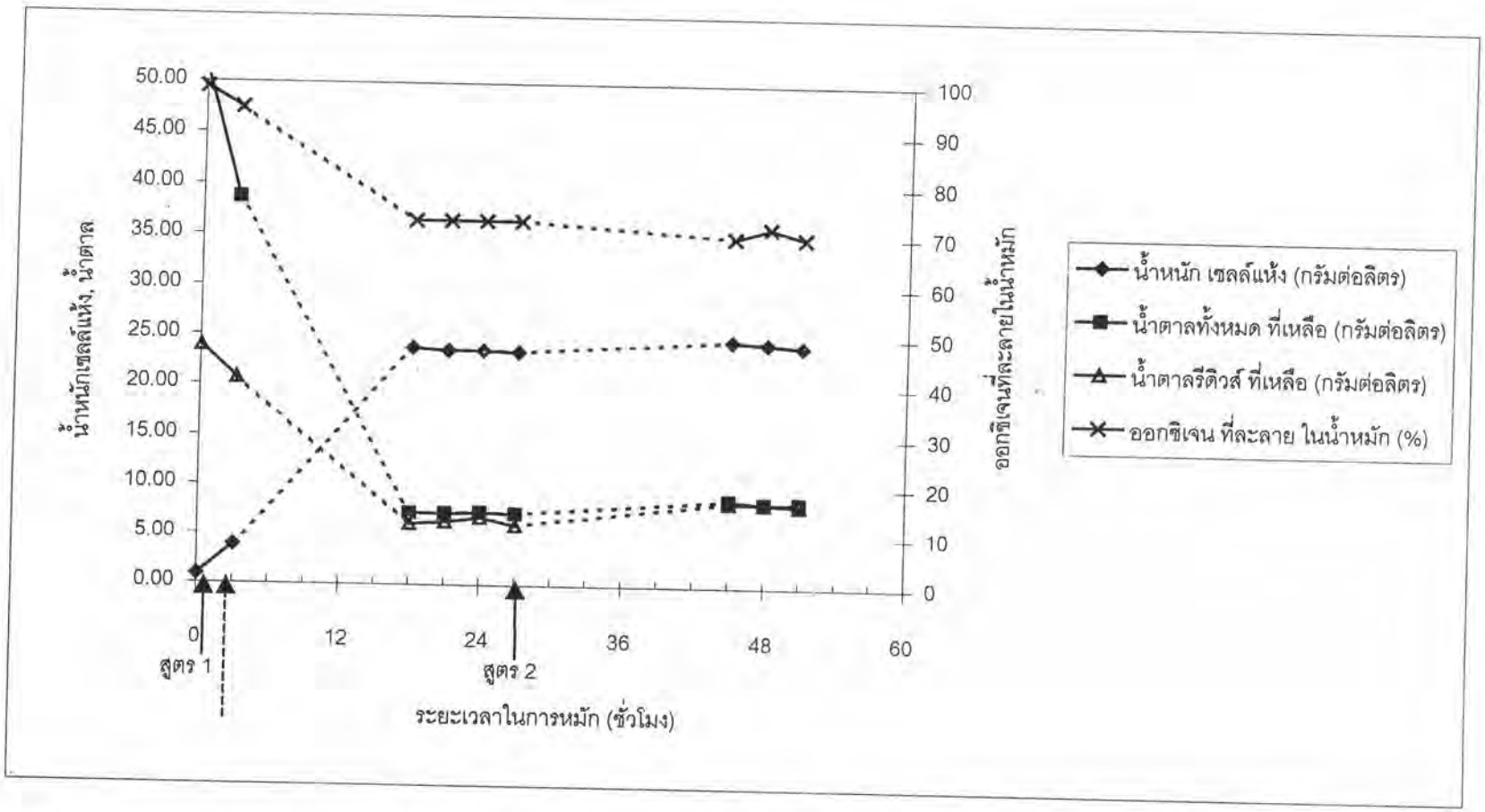
ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
1.71	21.64+/-0.25	8.12	6.78+/-0.12	0.65
2.27	24.43+/-0.07	9.16	6.46+/-0.12	0.73
2.38	24.45+/-0.09	9.17	6.35+/-0.20	0.73
2.16	23.00	8.62	6.62	0.69

3.13 ผลของทั้งความเข้มข้นของน้ำตาลและความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ใช้เติมต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง

จากที่ทราบกันแล้วว่าสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนมีผลต่ออัตราการเจริญของยีสต์ โดยถ้าสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนเหมาะสมจะส่งผลให้อัตราการเจริญของยีสต์สูง และจากผลการทดลองที่ 3.12 พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนจะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 8.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนจึงจะทำให้เซลล์ยีสต์มีการเจริญสูงสุด และจากผลการทดลองที่ 3.6 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 40 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 60 กรัมต่อลิตร แต่จำกัดปริมาณไนโตรเจนไว้ ส่งผลให้ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งอาจจะเกิดจากความไม่เหมาะสมระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนก็ได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงทดลองเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 40 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 60 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เพิ่มปริมาณแหล่งไนโตรเจนโดยให้สัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนคงที่ โดยเพิ่มแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 8.5 กรัมต่อลิตรไปเป็น 11.5 กรัมต่อลิตร และเพิ่มแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจาก 2.4 กรัมต่อลิตรไปเป็น 3.2 กรัมต่อลิตร (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ง. 7) เลี้ยงเชื้อในระบบต่อเนื่องที่อัตราการละลาย 0.250 ต่อชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.13.1 รูปที่ 3.13 และตารางที่ 3.13.2 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้สูตรอาหารสูตร 1 ซึ่งประกอบด้วยกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 8.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.4 กรัมต่อลิตร จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 23.58 กรัมต่อลิตร และสามารถคำนวณผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปได้ 0.72 แต่เมื่อเปลี่ยนมาใช้สูตรอาหารสูตร 2 ซึ่งประกอบด้วยกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 11.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.2 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เปลี่ยนไปเป็น 24.47 กรัมต่อลิตร และสามารถคำนวณผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปได้ 0.48 ถึงแม้สูตรอาหารสูตร 2 จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าในสูตรที่ 1 แต่เมื่อคำนวณผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปปรากฏว่าสูตรอาหารสูตร 1 ให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงกว่าสูตรที่ 2 มาก ดังนั้นเพื่อให้เกิดความคุ้มค่าในการลงทุนจึงเลือกสูตรอาหารสูตร 1 สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ต่อไป

ตารางที่ 3.13.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ โดยให้อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนคงที่ ที่อัตราการ เจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	สูตร 1	0.90	51.09	23.90	99
3	สูตร 1	3.89	38.67	20.74	95
18	สูตร 1	23.80	7.24	6.17	73
21	สูตร 1	23.55	7.24	6.39	73
24	สูตร 1	23.55	7.38	6.85	73
27	สูตร 1	23.43	7.26	6.05	73
45	สูตร 2	24.72	8.79	8.59	70
48	สูตร 2	24.47	8.55	8.51	72
51	สูตร 2	24.23	8.57	8.33	70



รูปที่ 3.13 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนต่างๆ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง (↑ คือเวลาเริ่มเปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและ ↑ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.13.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลและปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

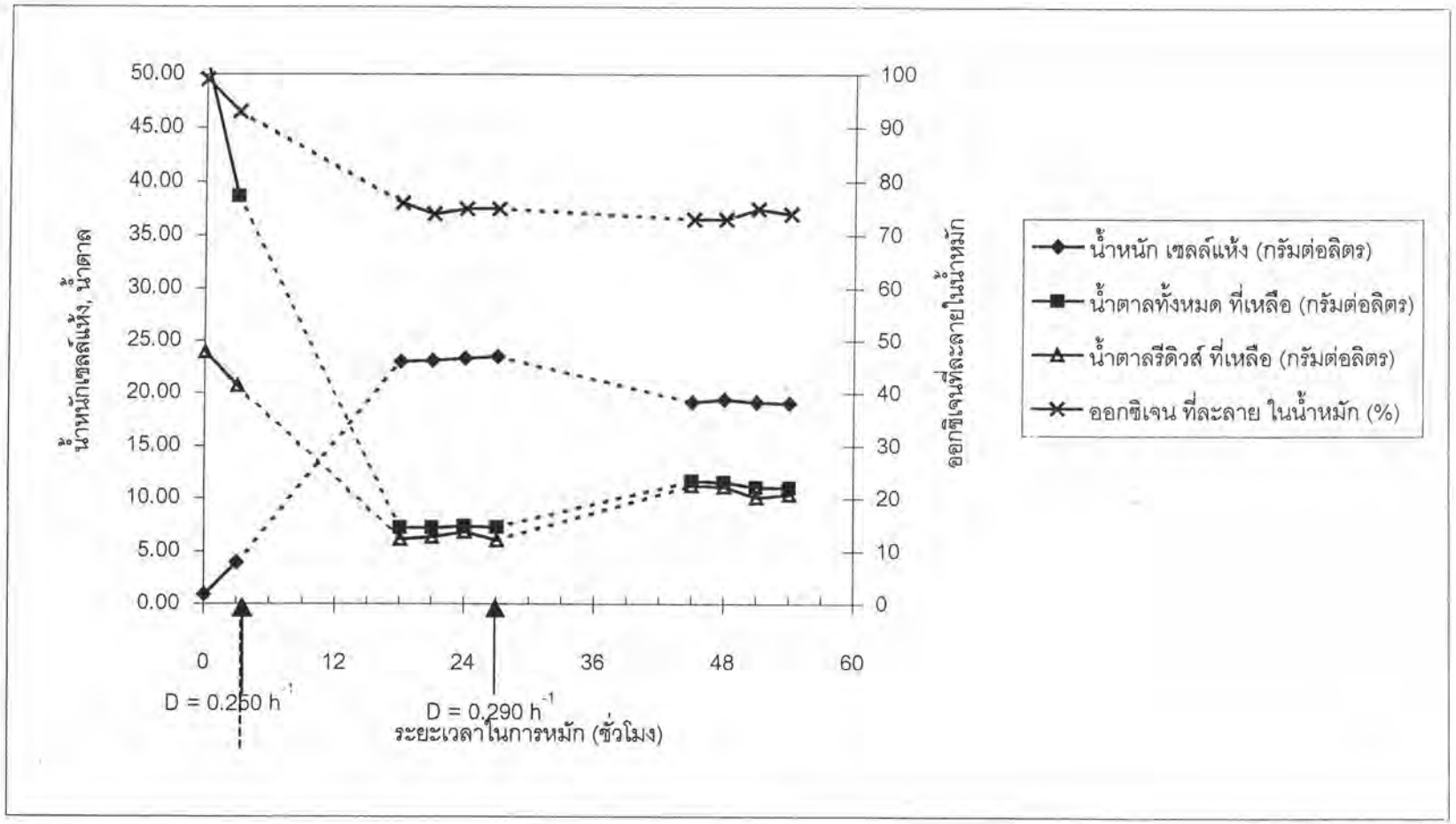
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
สูตร 1	23.58+/-0.15	8.84	7.78+/-0.07	0.72
สูตร 2	24.47+/-0.25	9.18	8.64+/-0.13	0.48

3.14 ผลของอัตราการเจือจางต่อการเจริญของยีสต์ในภาวะและสูตรอาหารที่ปรับปรุงแล้วในการหมักแบบต่อเนื่อง

จากผลการทดลองที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมเข้าสู่ระบบที่เหมาะสมคือ ใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 8.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.4 กรัมต่อลิตร โดยควบคุมภาวะของการหมักดังนี้คือ ควบคุมอัตราการกวนที่ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3 vvm ควบคุมอุณหภูมิที่ 33 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 และจากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่ผ่านมามีการควบคุมอัตราการเจือจางที่ 0.250 ต่อชั่วโมง ดังนั้นการเจริญของยีสต์อาจถูกจำกัดด้วยอัตราการเจือจางได้ โดยถ้าเพิ่มอัตราการเจือจางก็เท่ากับเป็นการเพิ่มอาหารให้แก่ระบบ และการเพิ่มอัตราการเจือจางก็เป็นการเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะด้วย ฉะนั้นการเพิ่มอัตราการเจือจางน่าจะให้ผลผลิตเซลล์ต่อชั่วโมงสูงขึ้น ดังนั้นการทดลองนี้จึงลองเพิ่มอัตราการเจือจางจาก 0.250 ต่อชั่วโมง ไปเป็น 0.290 ต่อชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.14.1, รูปที่ 3.14 และตารางที่ 3.14.2 เมื่อสังเกตน้ำหนักเซลล์แห้งที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 23.24 กรัมต่อลิตร และสามารถคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงได้ 8.72 กรัมต่อชั่วโมง ส่วนที่อัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 19.21 กรัมต่อลิตร และสามารถคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงได้ 8.36 กรัมต่อชั่วโมง จะเห็นได้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงที่ได้จากทั้งสองอัตราการเจือจางไม่แตกต่างกันมากนัก แต่สำหรับน้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาตรนั้นที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง ให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่อปริมาตรมากกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่งโมงมากซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อต้องการเซลล์ในปริมาณที่เท่ากันที่อัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่วโมง ต้องใช้ปริมาตรน้ำหมักสูงกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นการสิ้นเปลือง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง ให้ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป 0.71 ในขณะที่อัตราการเจือจาง 0.290 ต่อชั่วโมง ให้ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปลดลงเล็กน้อยคือเหลือ 0.67 ดังนั้นอัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง จึงเป็นอัตราการเจือจางที่เหมาะสมต่อภาวะการเจริญที่ได้กล่าวมาแล้ว

ตารางที่ 3.14.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (สูตร 1 จากข้อ 3.13; ภาคผนวก ก. 2.3) โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	-	0.90	51.09	23.90	99
3	-	3.96	38.67	20.74	93
18	0.250	23.00	7.24	6.17	76
21	0.250	23.12	7.24	6.39	74
24	0.250	23.36	7.38	6.85	75
27	0.250	23.49	7.26	6.05	75
45	0.290	19.18	11.69	11.23	73
48	0.290	19.43	11.54	11.15	73
51	0.290	19.18	11.11	10.14	75
54	0.290	19.06	11.03	10.37	74



รูปที่ 3.14 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง (↑ คือเวลาเริ่มเปลี่ยนอัตราการเจือจาง และ ↑ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.14.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.250 และ 0.290 ต่อชั่วโมง

อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
0.250	23.24+/-0.22	8.72	7.28+/-0.07	0.71
0.290	19.21+/-0.15	8.36	11.34+/-0.32	0.67

3.15 ระยะเวลาที่สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะไว้ได้

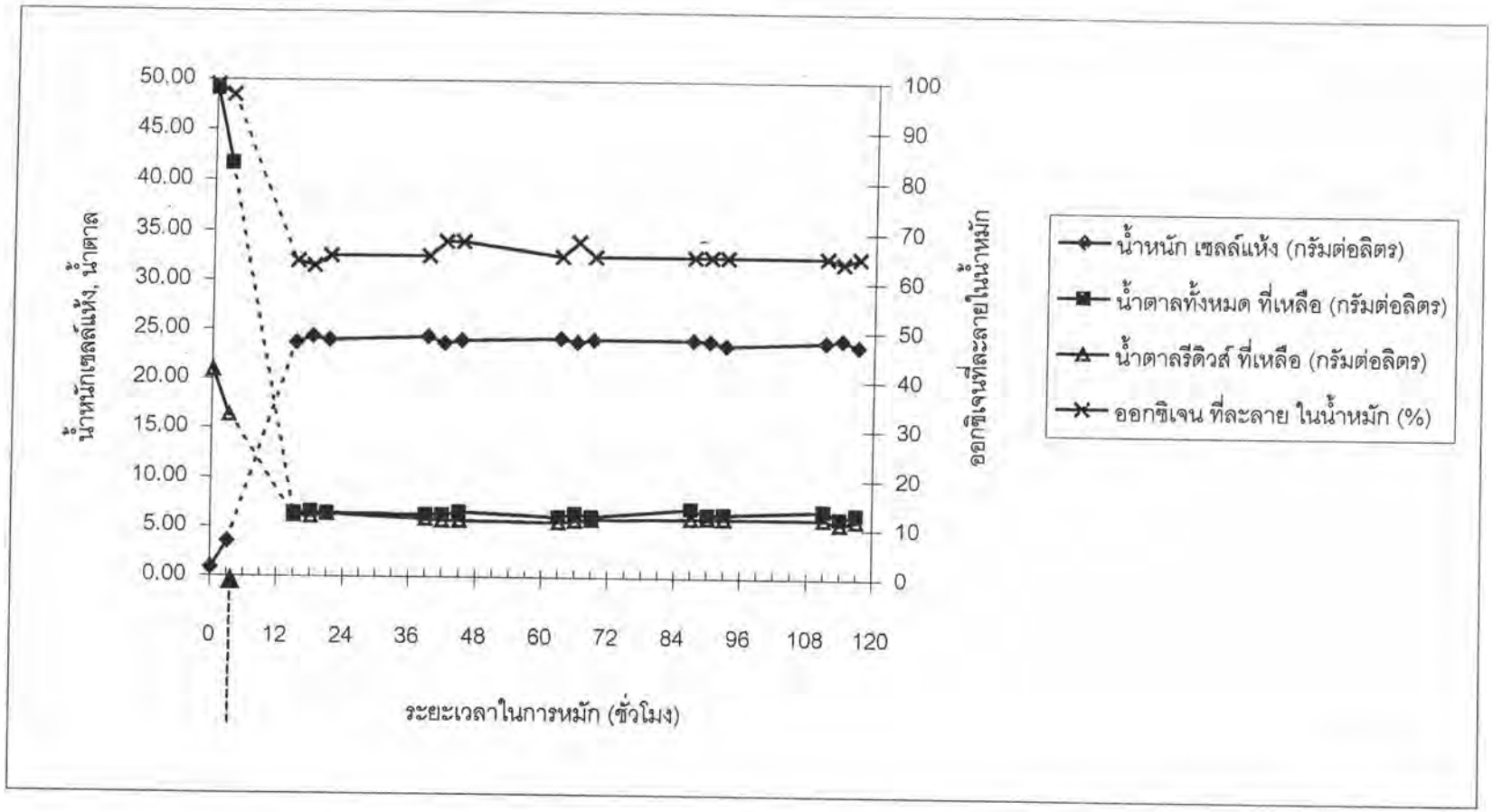
จากผลการทดลองที่ 3.14 ทำให้ทราบถึงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่อง โดยอัตราการเจือจางที่เหมาะสมคือ 0.250 ต่อชั่วโมง สำหรับการทดลองนี้ได้พยายามรักษาภาวะเหล่านี้ไว้ และสังเกตว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญหรือไม่ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.15.1, รูปที่ 3.15 และตารางที่ 3.15.2 จะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปถึง 5 วัน (117 ชั่วโมง) น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปไม่มีการเปลี่ยนแปลง นั่นแสดงว่าในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยภาวะที่กล่าวมาแล้วนี้ สามารถรักษาอัตราการเจริญจำเพาะได้อย่างน้อย 117 ชั่วโมง และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่องนี้

3.16 ผลของการนำน้ำหมักที่วิเคราะห์และเติมสารอาหารให้เท่ากับสูตรอาหารกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่

จากที่ได้กล่าวมาแล้วในบทนำว่า ในการหมักแบบต่อเนื่อง มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแก่ระบบและในขณะเดียวกันก็มีการดึงเอาน้ำหมักออกจากระบบตลอดเวลา เพื่อรักษาปริมาตรของน้ำหมักภายในระบบให้คงที่ โดยน้ำหมักที่ออกจากระบบจะต้องไปผ่านการแยกเซลล์ออกเพื่อนำเซลล์ไปผลิตผลิตภัณฑ์ต่อไป ในขณะที่ส่วนน้ำซึ่งประกอบด้วยสารอาหารที่เหลืออยู่บางส่วน เถ้า ของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ รวมทั้งสารที่ยีสต์สร้างขึ้นระหว่างการเจริญ จะต้องนำไปผ่านกระบวนการบำบัดก่อนทิ้งต่อไป ซึ่งจะเป็นการสิ้นเปลืองอย่างมาก ดังนั้นการทดลองนี้จึงลองนำน้ำหมักกลับมาใช้เลี้ยงเชื้อใหม่โดยวิเคราะห์สารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมักและเติมสารอาหารใหม่ลงไปให้เท่ากับที่มีอยู่ในสูตรอาหาร โดยสูตรอาหารที่ใช้ได้จากสูตรอาหารที่คัดเลือกแล้วจากผลการทดลองที่ 3.13 (ภาคผนวก ก. 2.3 และ 2.4) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.16.1, รูปที่ 3.16 และตารางที่ 3.16.2 จะเห็นได้ว่าในรอบที่ 0 (อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่) ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 23.86 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป 0.71 และในรอบที่ 1 (นำน้ำหมักที่ผ่านการหมักจากรอบที่ 0 มาแยกเซลล์ยีสต์ออกแล้วเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับรอบที่ 1) ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 22.59 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป 0.71 ซึ่งจะเห็นได้ว่าทั้งน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อนำน้ำหมักกลับมาใช้ในรอบที่ 2 และ 3 น้ำหนักเซลล์แห้งกลับลดลงอย่างมากจนเหลือ 10.53 และ 8.51 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปก็ลดลงเช่นกันคือเหลือ 0.44 และ 0.43 ตามลำดับ จากการทดลองนี้จึงเห็นได้ว่าสามารถนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่ได้เพียงรอบเดียว โดยที่เมื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักแต่ละรอบพบว่า ยิ่งรอบของการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือก็เพิ่มขึ้นด้วย รวมทั้งเมื่อสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อก็เข้มขึ้นด้วยเช่นกัน ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่าในระหว่างการหมักทั้งน้ำตาลและไนโตรเจนอาจถูกเปลี่ยนโครงสร้างทาง

ตารางที่ 3.15.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	-	0.87	49.03	20.89	99
3	-	3.52	41.66	16.30	97
15	1	23.73	6.37	6.15	64
18		24.35	6.54	6.05	63
21		23.98	6.39	6.31	65
39	2	24.35	6.30	5.88	65
42		23.73	6.26	5.70	68
45		23.98	6.55	5.72	68
63	3	24.23	6.07	5.58	65
66		23.86	6.47	5.78	68
69		24.10	6.15	5.86	65
87	4	24.10	6.99	5.99	65
90		23.98	6.42	6.02	65
93		23.61	6.46	5.98	65
111	5	23.98	6.89	5.98	65
114		24.23	6.12	5.50	64
117		23.61	6.51	5.88	65



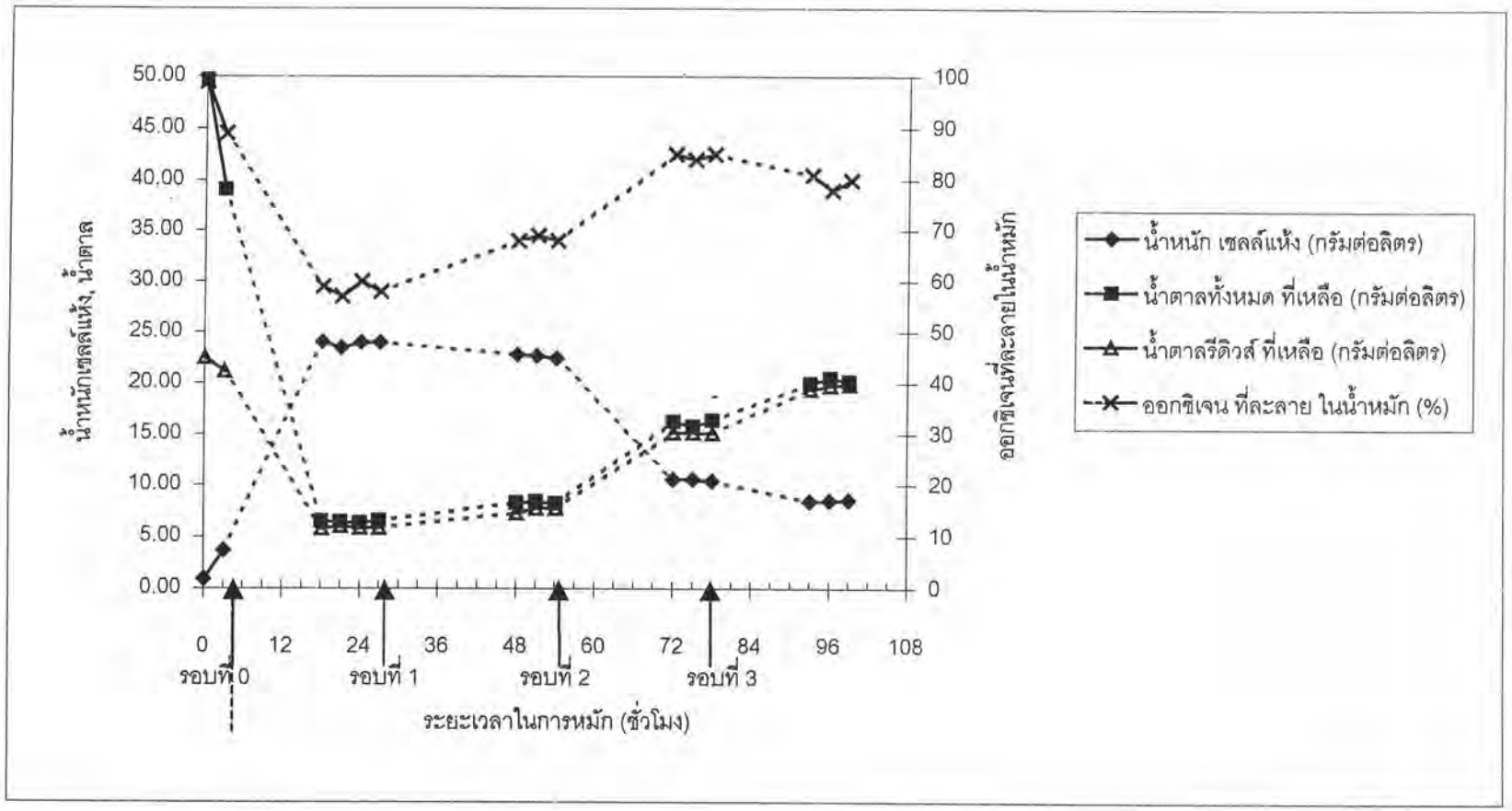
รูปที่ 3.15 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง (↑ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ เข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.15.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมงในแต่ละวัน

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
1	24.02+/-0.31	9.01	6.43+/-0.10	0.72
2	24.02+/-0.31	9.01	6.37+/-0.16	0.71
3	24.06+/-0.19	9.02	6.23+/-0.21	0.71
4	23.90+/-0.26	8.96	6.62+/-0.32	0.72
5	23.94+/-0.31	8.98	6.51+/-0.39	0.71

ตารางที่ 3.16.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.3) และนำน้ำหมักที่วิเคราะห์และเติมสารอาหารให้เท่ากับสูตรอาหารแล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	รอบของการนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	-	0.92	49.66	22.47	99
3	-	3.71	39.07	21.13	89
18	0	24.02	6.53	5.82	59
21		23.47	6.45	6.03	57
24		23.96	6.33	5.90	60
27		23.96	6.58	5.89	58
48	1	22.75	8.28	7.29	68
51		22.63	8.43	7.76	69
54		22.38	8.24	7.78	68
72	2	10.58	16.22	15.17	85
75		10.58	15.81	15.15	84
78		10.45	16.39	15.12	85
93	3	8.46	19.97	19.39	81
96		8.51	20.52	19.79	78
99		8.56	20.18	19.85	80



รูปที่ 3.16 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) และนำน้ำหมักที่วิเคราะห์และเติมสารอาหารให้เท่ากับสูตรอาหารแล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง (↑ คือเวลาเริ่มเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ↑ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.16.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) และนำน้ำหมักที่วิเคราะห์และเติมสารอาหารให้เท่ากับสูตรอาหารแล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

รอบของการนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
0	23.86+/-0.26	8.95	6.47+/-0.11	0.71
1	22.59+/-0.19	8.47	8.31+/-0.10	0.71
2	10.53+/-0.07	3.95	16.4+/-0.30	0.44
3	8.51+/-0.05	3.19	20.22+/-0.28	0.43

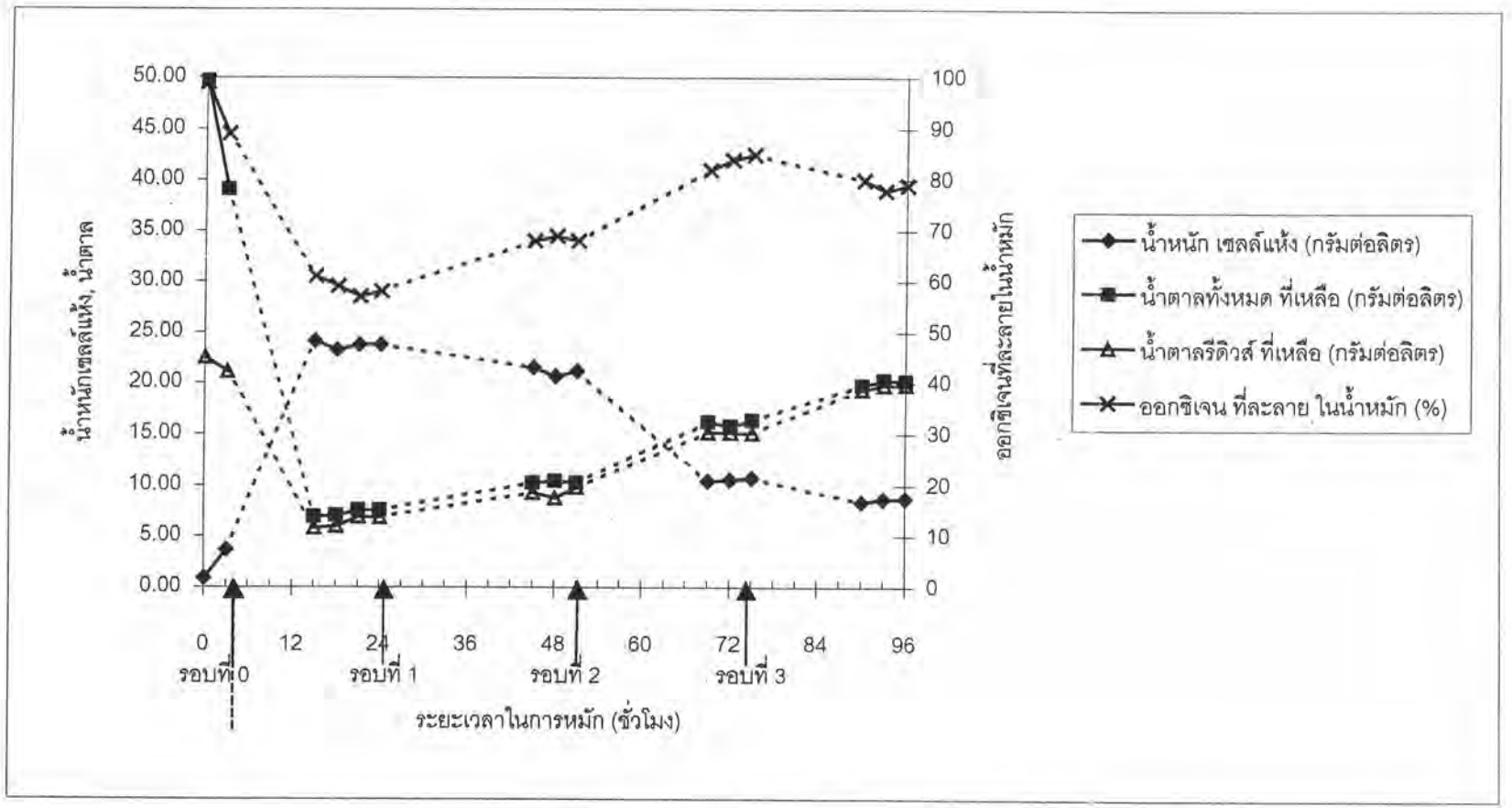
เคมีไปจนเชื้อยีสต์ไม่สามารถนำสารเหล่านี้ไปใช้ได้ แต่ยังคงวิเคราะห์ได้จากน้ำหมัก ทำให้ปริมาณสารอาหารใหม่ที่เติมลงในน้ำหมักเพื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปมีน้อยกว่าความต้องการของยีสต์ส่งผลให้การเจริญลดลง หรืออาจเนื่องมาจากในน้ำหมักมีสารยับยั้งการเจริญเพิ่มขึ้น โดยในระหว่างการหมัก ยีสต์อาจจะมีการสร้างสารซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของตัวมันเองได้ นอกจากนี้การเติมกากน้ำตาลลงไปในน้ำหมักเพื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่นั้นยังเป็นการเพิ่มเถ้า ของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ รวมทั้งสีให้แก่ระบบ ซึ่งสารเหล่านี้มีผลให้ความสามารถของออกซิเจนที่จะละลายในน้ำหมักลดลง ซึ่งส่งผลให้การเจริญของยีสต์ลดลง

3.17ผลของการนำน้ำหมักที่เติมสารอาหารตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว โดยไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมักกลับมาใช้เลี้ยงเชื้อใหม่

จากผลการทดลองที่ 3.16 จะเห็นได้ว่าการที่สามารถนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่ได้เพียงรอบเดียวอาจเกิดจาก 2 สาเหตุคือ สารอาหารที่เติมให้แก่ระบบไม่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ หรือสารยับยั้งการเจริญที่มีอยู่ในน้ำหมักส่งผลให้การเจริญของยีสต์ลดลง ดังนั้นเพื่อไม่ให้สารอาหารเป็นข้อจำกัดของการนำน้ำหมักกลับมาใช้เลี้ยงเชื้อใหม่ การทดลองนี้จึงเติมสารอาหารตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้วลงในน้ำหมัก โดยไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก จากนั้นนำน้ำหมักไปผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.17.1, รูปที่ 3.17 และตารางที่ 3.17.2 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในรอบที่ 0 (อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่) ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 23.70 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป 0.72 และในรอบที่ 1 (นำน้ำหมักที่ผ่านการหมักจากรอบที่ 0 มาแยกเซลล์ยีสต์ออกแล้วเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับรอบที่ 1) ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 21.11 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป 0.71 ซึ่งจะเห็นได้ว่าทั้งน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อนำน้ำหมักกลับมาใช้ในรอบที่ 2 และ 3 น้ำหนักเซลล์แห้งกลับลดลงอย่างมากจนเหลือ 10.58 และ 8.58 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปก็ลดลงเช่นกันคือเหลือ 0.44 และ 0.43 ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าค่าต่าง ๆ ที่ได้ใกล้เคียงและเป็นรูปแบบเดียวกับการทดลองในข้อ 3.16 คือสามารถนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่ได้เพียงรอบเดียว โดยที่เมื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือในน้ำหมักแต่ละรอบพบว่า ยิ่งรอบของการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนที่เหลือก็เพิ่มขึ้นด้วย จึงสามารถสรุปได้ว่าสารอาหารไม่น่าจะเป็นข้อจำกัดของการนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่ เพียงนำน้ำหมักมาวิเคราะห์และเติมสารอาหารให้เท่ากับสูตรอาหารก็เพียงพอสำหรับการเจริญของยีสต์แล้ว การเพิ่มสารอาหารเข้าไปอีกไม่ส่งผลให้การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น ดังนั้นข้อจำกัดของการนำน้ำหมักกลับมาใช้เลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3.17.1 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.3) และนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร (โดยไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก) แล้ว กลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	รอบของการนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (%)
0	-	0.92	49.66	22.47	99
3	-	3.71	39.07	21.13	89
15	0	24.10	6.93	5.82	61
18		23.24	7.05	6.03	59
21		23.73	7.53	6.90	57
24		23.73	7.58	6.89	58
45	1	21.52	10.26	9.29	68
48		20.66	10.43	8.76	69
51		21.15	10.24	9.78	68
69	2	10.45	16.22	15.17	82
72		10.58	15.81	15.15	84
75		10.70	16.39	15.12	85
90	3	8.36	19.77	19.39	80
93		8.66	20.32	19.79	78
96		8.71	20.18	19.85	79



รูปที่ 3.17 การเจริญของยีสต์ SG1 ในการหมักแบบต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก 2.3) และนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร (โดยไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก) แล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง (↑ คือเวลาเริ่มเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ↑ คือเวลาที่เริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ)

ตารางที่ 3.17.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ SG1 ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก. 2.3) และนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหาร (โดยไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก) แล้วกลับมาเลี้ยงเชื้อใหม่ ในการหมักแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.250 ต่อชั่วโมง

รอบของการนำน้ำหมักกลับมาใช้ใหม่	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)	น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป
0	23.70+/-0.35	8.89	7.27+/-0.33	0.72
1	21.11+/-0,43	7.92	10.31+/-0.10	0.71
2	10.58+/-0.12	3.97	16.14+/-0.30	0.44
3	8.58+/-0.19	3.22	20.09+/-0.29	0.43

ใหม่น่าจะเป็นสารยับยั้งการเจริญที่มีอยู่ในน้ำหมัก ซึ่งสารเหล่านี้จะไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนระหว่างการฆ่าเชื้อ