บทที่ 2
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 การหมัก

การหมัก (Fermentation) เป็นรากศัพท์มาจากภาษาลาติน “fervere” แปลว่า “เดือด” ซึ่งครั้งแรกใช้เพื่ออธิบายลักษณะที่เกิดจากการกระทำของยีสต์ในน้ำสกัดผลไม้ หรือเมล็ดข้าวมอลท์ เนื่องจากยีสต์ย่อยสลายน้ำตาลภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ทำให้เกิดฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผุดขึ้นมาเหมือนน้ำเดือด ในทางชีวเคมี การหมักหมายถึงการสร้างพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์เนื่องจากเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ส่วนการหมักในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม หมายถึงกระบวนการผลิตผลผลิตใดๆ ก็ตามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก (mass culture) ซึ่งจะครอบคลุมทั้งกระบวนการแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน ในขณะที่การหมักทางชีวเคมีจะหมายถึงเฉพาะกระบวนการแบบไม่ใช้ออกซิเจนเท่านั้น

2.1.1 ชนิดของการหมัก

การหมักแบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ได้เป็น 3 ชนิด คือ

2.1.1.1 Batch fermentation เป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งทำในระบบปิดที่มีสารอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงไปในระบบแล้ว จะไม่มีการเติมสารอาหารใดๆ เพิ่มลงไปอีก

2.1.1.2 Continuous fermentation เป็นการหมักแบบต่อเนื่อง โดยมีการเติมสารอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา จึงทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

2.1.1.3 Fed-batch fermentation เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้เพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดในเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอ

2.1.2 ขั้นตอนในกระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักโดยทั่วไป ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 6 ขั้นตอน ดังนี้คือ

2.1.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่ใช้ในการผลิตเชื้อเริ่มต้น และใช้ในกระบวนการหมัก

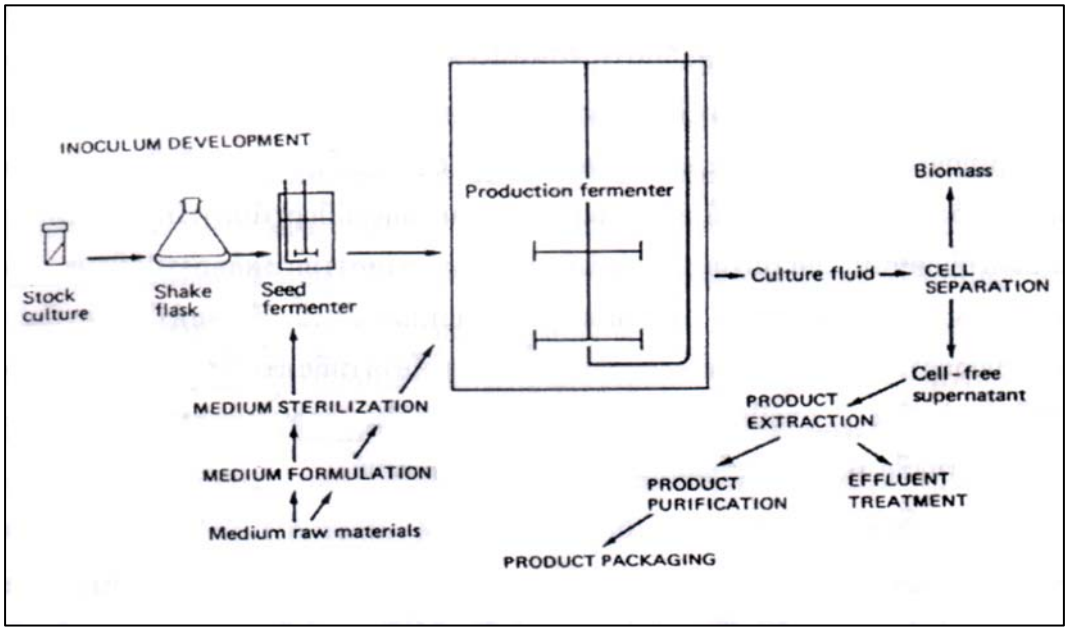
2.1.2.2 การทำอาหารเลี้ยงเชื้อ ถังหมัก และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง ให้ปราศจากเชื้อ

2.1.2.3 การผลิตเชื้อเริ่มต้นที่บริสุทธิ์ และว่องไว (active) ในปริมาณที่มากพอสำหรับการหมัก

2.1.2.4 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมัก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารที่ต้องการ

2.1.2.5 การสกัดผลผลิตและการทำให้บริสุทธิ์

2.1.2.6 การกำจัดของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทั้งหมด



ภาพที่ 2.1 แสดงขั้นตอนและความสัมพันธ์ของขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการหมัก

(Stanbury and Whitaker, 1984 หน้า 9)

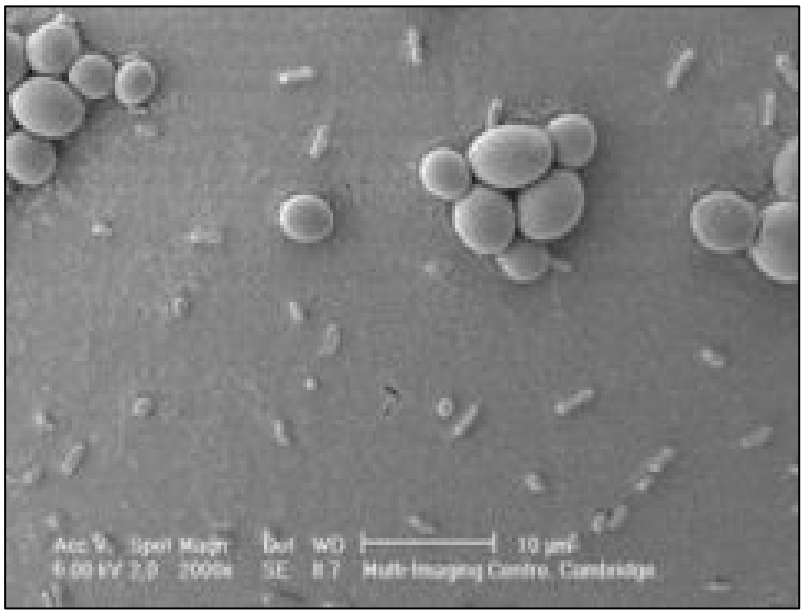
2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล

การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (starter หรือ inoculum) ที่ใช้ในการหมัก มีความสำคัญมากเพราะจะมีผลต่อกระบวนการหมักทั้งหมด รวมทั้งระยะเวลาในการหมักและต้นทุนการผลิต

2.2.1 เชื้อยีสต์ (yeast)

เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลเป็นอาหารเพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ และในขณะเดียวกันทำให้เกิดการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเรียกว่ากระบวนการหมัก (fermentation) ขณะเดียวกันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีควบคู่กันไปด้วย

ยีสต์ที่มีประโยชน์ในการผลิตอาหารหลายอย่าง ที่ทุกคนรู้จักกันดี คือ *S. erevisiae* หรือยีสต์ขนมปัง ยีสต์ชนิดมนุษย์ได้นำมาใช้ประโยชน์มานานแล้ว ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้น้ำตาลแล้วผลิตแอลกอฮอล์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ยีสต์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร



ภาพที่ 2.2 แสดงยีสต์ (*S. erevisiae*)
(ที่มา : รูปซ้าย ex E.C. Hansen)

เหตุผลที่เลือก *S. erevisiae* ในการทดลองเนื่องจากยีสต์สายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

2.2.1.1. เจริญได้เร็วในอาหารที่มีราคาถูก และเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย

2.2.1.2. เจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบ ง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน มีความต้องการวิตามินและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญต่าง ๆ น้อย ให้ผลผลิตสูง

2.2.1.3. มีความต้านทานต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ และใช้ขบวนการหมักอย่างง่าย ๆ ในการเจริญ

2.2.1.4. ใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2.1.5. หลังจากผ่านขบวนการหมักแล้วมีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย

2.2.1.6. เก็บรักษาได้ง่าย เช่น การทำให้แห้งและง่ายต่อการขนส่ง

2.2.2 การเก็บรักษาเชื้อยีสต์

จะทำการเก็บรักษาเชื้อยีสต์ โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ โดยเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงอยู่บนอาหารวุ้นเอียง เมื่อนำไปเก็บในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส จะมีอายุการเก็บได้นานประมาณ 6 เดือน และถ้าเททับด้วยน้ำมันแร่ (mineral oil, sterile medicinal grade) ก็จะยืดอายุการเก็บไปได้นานถึง 1 ปี

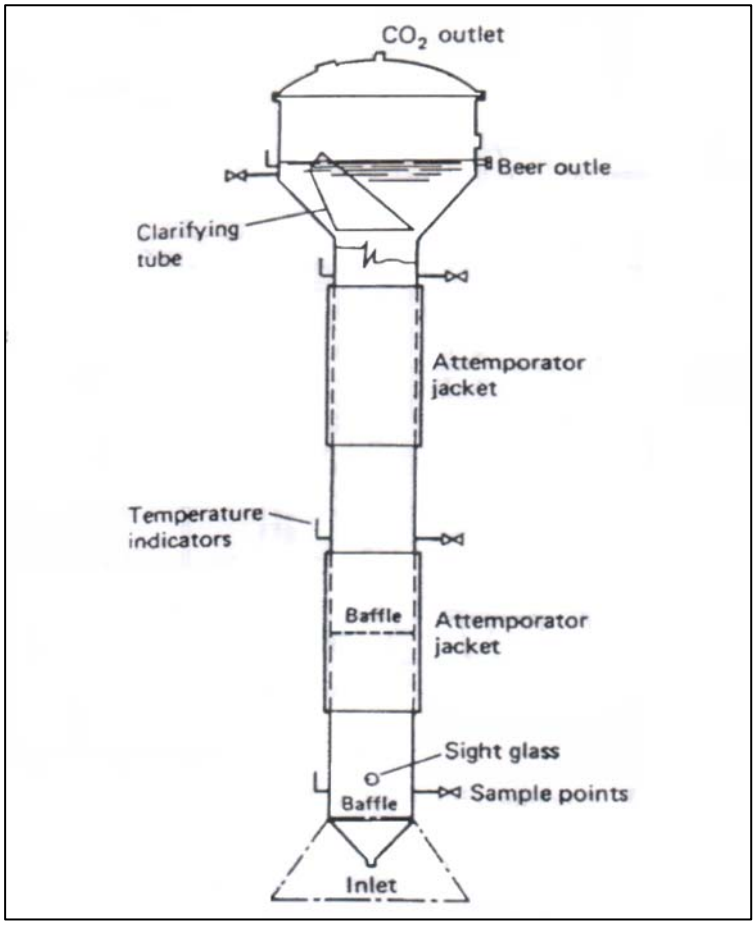
2.2.3 การควบคุมคุณภาพเชื้อยีสต์ที่เก็บรักษาไว้

การเก็บรักษาเชื้อยีสต์ในอุตสาหกรรมการหมักนั้น จำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของจุลินทรีย์ที่ต้องการนำไปเก็บรักษาให้ดีเสียก่อน โดยนำโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อยีสต์ที่จะเก็บรักษาไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อตรวจสอบสมบัติต่างๆ ว่าถูกต้อง

2.3 ถังหมัก

หน้าที่สำคัญของถังหมักได้แก่ การทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการ การออกแบบถังหมักเพื่อใช้ในกระบวนการหมักแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไป

ถังหมักแบบ tower fermenter เป็นถังหมักทรงสูงไม่มีเครื่องกวน ประกอบด้วยคอลัมน์แก้วที่มีเครื่องสูบสับสเตรทและเครื่องให้อากาศเข้าสู่ถังหมักทางด้านฐาน ให้ผลผลิตออกมาทางด้านบนของถังหมัก สามารถใช้หมักแบบต่อเนื่องและแบบ batch ในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์



ภาพที่ 2.3 ไดอะแกรมแสดงลักษณะของ tower fermenter ที่ใช้ในการผลิตเบียร์

(Stanbury and Whitaker, 1984 หน้า 20)

2.4 การตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ คือ การกำจัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง หรือทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยที่เซลล์จุลินทรีย์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน (Karel และคณะ, 1985) และยังสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง สภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นอาจจะกำลังเจริญ กำลังพักตัวหรือตายก็ได้ โดยที่ระบบเอนไซม์หรือ biocatalyst ไม่ล้มเหลว

2.4.1 วิธีการตรึงเซลล์

2.4.1.1 การตรึงเซลล์แบบยึด (attachment or adsorption to a preformed cerrier) เป็นวิธีตรึงเซลล์ที่ง่ายที่สุด โดยยึดเซลล์ไว้กับตัวกลางโดยใช้การดูดซับ สารตัวกลางที่ใช้ยึดต้องไม่ละลายน้ำ เช่น EDTA cellulose ion-exchange resin การเลือกใช้สารยึดต้องคำนึงถึงความสามารถในการเกาะยึด และไม่ทำให้เซลล์สูญเสียกิจกรรม เซลล์บางส่วนอาจหลุดได้เพราะไม่มีการใช้สารอื่นช่วย อาศัยเพียงพันธะไฮโดรเจนหรือแรงวัลเดอร์วาล์ล และการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้บางครั้งใช้การยึดเกาะด้วยแรงโคเวเลนท์ ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์โดยใช้ประจุร่วมกันระหว่างสารตัวนำ

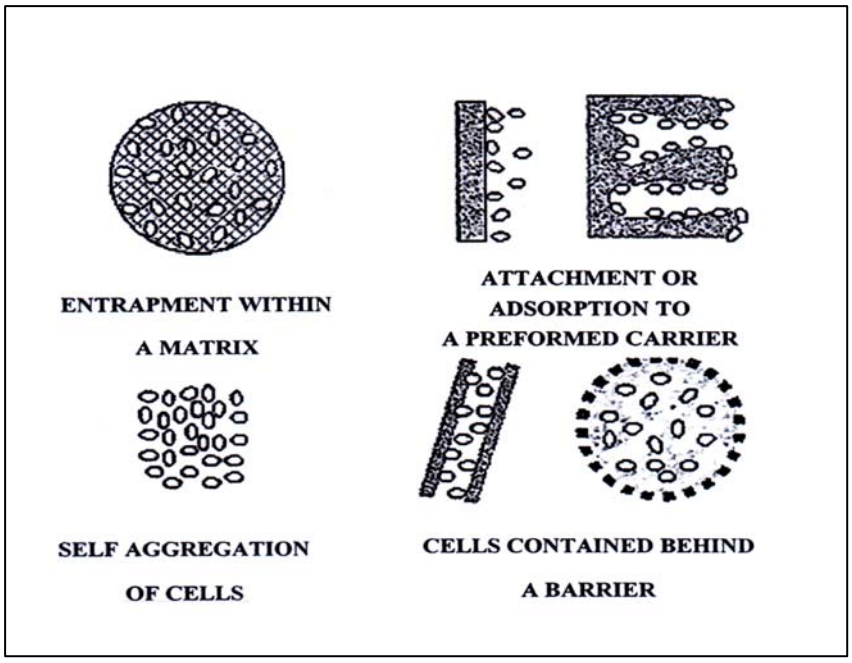
2.4.1.2 การตรึงเซลล์แบบการเชื่อมไขว้ (entrapment within a matrix) เป็นการใช้สารเคมีเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าไว้ด้วยกัน โดยใช้สารเคมีพวก glutaraldehyde toluene การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ใช้ปฏิกิริยาที่ต่างกัน ได้แก่ เชื่อมเซลล์กับสารตัวกลาง ดูดเกาะเซลล์ที่ผิวหน้าสารยึดเกาะเชื่อมเซลล์กับเซลล์ หรือการกักเซลล์ไว้ในสารที่มีรูพรุน

2.4.1.3 การตรึงเซลล์แบบการห่อหุ้ม (contain behind a berrier) เป็นวิธีการตรึงเซลล์ในสารประกอบพวกเจลที่จับกันเป็นโพลิเมอร์ มีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดเล็กกันเซลล์หลุด แต่วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ต้องผ่านออกมาได้ วิธีนี้นิยมใช้มากแต่พบปัญหาคือเกิดปฏิกิริยาช้าเพราะมีเจลกั้น ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยใช้ glutaraldehyde เชื่อมไว้

2.4.1.4 การตรึงเซลล์โดยการรวมตัวของเซลล์ (self aggregation by flocculation) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยอาศัยการรวมตัวของเซลล์ เซลล์จะถูกเชื่อมกับเซลล์ด้วยแรงพันธะอ่อน การตรึงเซลล์วิธีนี้มีข้อเสีย คือเซลล์บางส่วนอาจหลุดได้ เพราะไม่มีการใช้สารอื่นช่วย

2.4.2 วัสดุยึดเกาะในการตรึงเซลล์

วัตถุประสงค์หลักของการตรึงเซลล์คือ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ในพื้นที่ของวัสดุยึดเกาะและเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตในกระบวนการ วัสดุยึดเกาะที่นิยมใช้คือ alginate, agar, pectin, polyacrylamide และ carageenan และได้มีการใช้วัสดุธรรมชาติบางชนิดเช่น เปลือกไม้ หิน หรือฝ้าย(ที่มา : http://www.rcub.bg.ac.yu/~todorom/tutorials/rad15.html)



ภาพที่ 2.4 แสดงการตรึงเซลล์แบบต่างๆ

(ที่มา : http://www.rcub.bg.ac.yu/~todorom/tutorials/rad15.html)

2.4.3 คุณสมบัติของวัสดุยึดเกาะในการตรึงเซลล์

2.4.3.1 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะสูง

2.4.3.2 สามารถนำมาใช้ในการตรึงเซลล์ได้ง่ายและราคาถูก

2.4.3.3 มีความคงตัวสูงเมื่อใช้เป็นเวลานาน

2.4.3.4 มีความปลอดภัยในการใช้งานและมีการปนเปื้อนน้อย

2.4.4 ข้อดีของการตรึงเซลล์

2.4.4.1 การตรึงเซลล์ทำให้เกิดการใช้สารอาหารดีกว่าใช้เซลล์อิสระ

2.4.4.2 การตรึงเซลล์ทำให้ควบคุมการผลิตได้ง่าย สามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกไปได้ง่าย

2.4.4.3 เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้และทนต่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ได้สูง

2.4.4.4 ไม่พบปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น

2.4.5 ข้อเสียของการตรึงเซลล์

2.4.5.1 เซลล์อาจสูญเสียความสามารถบางอย่างไปเนื่องจากถูกตรึงเซลล์

2.5 บทบาทของการตรึงเซลล์ในกระบวนการหมัก

เทคโนโลยีอาหารและเครื่องดื่ม มีการใช้กระบวนการตรึงเซลล์ (cell immobilization) ในการผลิต specific metabolite เช่น เอนไซม์ กรดอะมิโน แอลกอฮอล์ และเบียร์ ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีของการตรึงเซลล์เข้ามาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทเบียร์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก รวมถึงลดปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก การใช้เทคโนโลยีการตรึงเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมัก จะส่งผลช่วยให้อากาศผ่านถังหมักได้เพียงเล็กน้อย และสามารถกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในกระบวนการหมักเบียร์จะช่วยลดระยะเวลาในการหมัก แต่ไม่ส่งผลเสียต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์

การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในกระบวนการหมักเบียร์นั้น นิยมใช้สำหรับกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงในปริมาณมากและสามารถลดต้นทุนในการผลิต โดยส่วนใหญ่นิยมใช้ในขั้นตอนการบ่ม (maturation หรือ aging) หรือในระหว่างกระบวนการหมักครั้งที่ 2 (secondary fermentation) ของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องสาเหตุเนื่องมาจากการตรึงเซลล์จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ metabolism และรูปแบบการเจริญของเซลล์ซึ่งส่งผลให้เกิดข้อจำกัดของการเกิด mass transfer (Nedovic และคณะ 2003)

การศึกษาใช้สารอาหารของยีสต์และการสร้างผลิตภัณฑ์ในระบบการตรึงเซลล์นั้น มีรายงานข้อมูลที่ชัดเจนว่าระบบการตรึงเซลล์จะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิต เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลและการสร้างแอลกอฮอล์ที่เพิ่มมากขึ้น มีการศึกษากระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยเซลล์ที่ถูกตรึงบน porous glass โดย Navarro และ Durands (1977) พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีอัตราการใช้กลูโคสที่สูงกว่าเซลล์อิสระ และในกระบวนการหมักที่ใช้การตรึงเซลล์จะพบการสร้างแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น และพบปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ลดลง (de Ory และคณะ, 2004)

Junter และคณะ(2002) รายงานว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ได้สูงกว่าเซลล์อิสระ เนื่องจากพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เท่ากับ 12 % พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกตรึงมากกว่า 50 % แต่สำหรับเซลล์อิสระนั้นพบว่า มีจำนวนน้อยกว่า 30 % ที่พบการรอดชีวิตในระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ เท่ากับ 9.6 % ความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่สูงมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิ่มตัวในเซลล์ที่ถูกตรึง (Hilge-Rotmann และ Rehm, 1991)

การศึกษาการหมักเบียร์ด้วย *S. erevisiae* ที่ถูกตรึงเซลล์บน calcium-pectate และ K-caragenan ที่อุณหภูมิในการหมักแตกต่างกัน พบว่าปริมาณ diacetyl ในเบียร์ที่ผ่านการหมักด้วย

เซลล์ที่ถูกตรึงจะลดลง เมื่ออุณหภูมิในการหมักเพิ่มมากขึ้น และในทางตรงกันข้ามในเบียร์ที่ผ่านการหมักด้วยเซลล์อิสระ ปริมาณ diacetyl จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมในถังหมักที่ใช้เซลล์ที่ถูกตรึงจะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 10-15 °C ที่ resident time เท่ากับ 2 ชั่วโมง หรือน้อยกว่านั้นจะส่งผลให้เกิดการลดลงของ diacetyl โดยที่ diacetyl จะถูกเปลี่ยนไปเป็น acetoin

2.6 ไคเนติกส์ของการหมัก

การศึกษาไคเนติกส์ของการหมัก (fermentation kinetics) เป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้เราทราบธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น การเจริญของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของสับสเตรท การเกิดผลผลิต การเปลี่ยนแปลงของpH และอุณหภูมิ รวมทั้งปริมาณออกซิเจนที่ถูกดูดซึมไปใช้ โดยบ่งบอกปริมาณการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเลขอย่างแน่ชัด ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไคเนติกส์ของการหมักนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการควบคุมปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการหมัก รวมทั้งการจัดการระบบการหมักให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

ในการทำโครงการจะมุ่งหวังที่จะให้ได้เอทานอลจากการหมักน้ำตาลอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการที่จะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลให้มากและเหมาะสมที่สุดจึงเป็นสิ่งสำคัญ จึงพยายามหาอัตราการไหลของปั๊ม และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำตาล) ที่เหมาะสมที่สุดหรือจุด Optimum ดังนั้นจึงต้องทดสอบเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการไหลของปั๊ม และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อหลายๆค่าเพื่อหาจุดที่เหมาะสมที่สุด ปัจจัยที่มีผลต่อการการเลือกอัตราการไหล

2.5.1 อัตราไหลของปั๊มสูงสุดและต่ำสุด

2.5.2 ปริมาตรของถังหมัก ต้องเป็นปริมาตรที่ลบจากปริมาตรแกลบแล้ว

2.5.3 เวลาที่ใช้ในการหมัก

2.5.4 จากการคำนวณหาค่าอัตราการไหลวิกฤติที่จะทำให้ยีสต์ไหลออกจากถังจนหมด (wash out) ดังนั้นอัตราการไหลสูงสุดต้องไม่เกินนี้ (Monod in 1942)

$$F_{crit} = \left[\frac{\mu_{\max} \cdot s^F}{K_s + s^F} \right] V \qquad (2.1)$$

เมื่อ F_{CRIT} คือ อัตราการไหลวิกฤติ (ml/min)

μ_{max} คือ อัตราจำเพาะสูงสุดของการเจริญ (h^{-1})

S^F คือ ความเข้มข้นของสารอาหารที่เติม (g/l)

K_S คือ ค่าคงที่อิ่มตัว (g/l)

V คือ ปริมาตรของถังหมัก (ml)

ซึ่งค่า μ_{max} และ K_S จะได้จากการทดลองต่อไป

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องจะมีการถ่ายอาหารเก่าออกจากภาชนะจำนวนหนึ่งและเติมอาหารใหม่เข้าไปแทนที่ในปริมาณเท่าเดิม จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง และถ้ามีการถ่ายเทอาหารเก่าและเติมอาหารใหม่เข้าสู่ภาชนะอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราที่เหมาะสม จะทำให้เกิดสภาวะคงที่ (steady state) กล่าวคือปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จะเท่ากับปริมาณเซลล์ในอาหารเก่าที่ปล่อยออกจากภาชนะ ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ภาชนะกับปริมาตรของภาชนะเรียกว่า อัตราการเจือจาง (dilution rate, D)

$$D = F / V \tag{2.2}$$

เมื่อ F = อัตราการเติมอาหารเหลวใหม่ (l/h)

V = ปริมาตรของการหมัก (l)

D = อัตราการเจือจาง (h^{-1})

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ในระยะเวลาหนึ่ง โดยที่อัตราการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่อเวลาขึ้นอยู่กับ อัตราการเติมเซลล์ อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ อัตราการตายของจุลินทรีย์ และปริมาณของเซลล์ที่หายไปเนื่องจากการไหลออกไปกับน้ำหมักดังนี้

$$\frac{dx}{dt} = cell_{in} + growth - death - cell_{out} \tag{2.3}$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{F}{V}(x_0) + \mu(x) - \alpha(x) - \frac{F}{V}(x) \tag{2.4}$$

เมื่อ x_0 = ปริมาณเซลล์ที่เติม

α = อัตราจำเพาะของการตาย

เมื่อไม่มีการเติมเซลล์ และอัตราการตายของจุลินทรีย์มีค่าน้อยมากถ้าเทียบกับอัตราการเจริญ จะได้ว่า

$$\frac{dx}{dt} = \frac{F}{V}(x_0) + \mu(x) - \alpha(x) - \frac{F}{V}(x)$$

$$\frac{dx}{dt} = growth - cell_{out}$$

กล่าวคือ $$\frac{dx}{dt} = \mu(x) - \frac{F}{V}(x) = \mu(x) - D(x) \quad (2.5)$$

ที่สภาวะคงที่ (steady state) ปริมาณเซลล์คงที่ ฉะนั้น $\frac{dx}{dt} = 0$ จะได้ว่า

$\boldsymbol{\mu}(x) = D(x)$ นั่นคือ $\boldsymbol{\mu} = \mathbf{D}$

จะเห็นว่าภายใต้สภาวะคงที่ อัตราจำเพาะของการเจริญ ถูกกำหนดโดยอัตราการเจือจาง ซึ่งเมื่อนำค่าอัตราจำเพาะของการเจริญจากสมการของ Monod

$$\boldsymbol{\mu} = \frac{\mu_{\max} \times S}{K_s + S} \quad (2.6)$$

แทนลงในสมการ (2.5) จะได้

$$\frac{dx}{dt} = (x)\left(\frac{\mu_{\max} \times S}{K_s + S} - D\right) \quad (2.7)$$

เมื่อ x = ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (g/l)

t = เวลาที่ใช้ในการหมัก (h)

$\boldsymbol{\mu_{max}}$ = อัตราจำเพาะสูงสุดของการเจริญ (h^{-1})

K_s = ปริมาณความเข้มข้นของ s ที่ $\boldsymbol{\mu} = \frac{1}{2\mu_{\max}}$ (g/l)

S = ปริมาณความเข้มข้นของสารอาหารใหม่ที่เติม (g/l)

D = อัตราการเจือจาง (h^{-1})

การหมักแบบต่อเนื่องมีหลายวิธี เช่น วิธีเทอร์บิโดสแตท วิธีฟลักโฟล และวิธีคีโมสแตท เหตุที่เลือกวิธีคีโมสแตทเนื่องจากสองวิธีแรกใช้อุปกรณ์และเซนเซอร์ที่มีราคาแพงแต่วิธีคีโมสแตทเป็นการควบคุมทางเคมี นั่นก็คือ การควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในการเลี้ยงเชื้อ และต้องควบคุมให้อัตราการเติมสารอาหาร (substrate) ให้เท่ากับอัตราการไหลออกของน้ำหมัก (product)

2.7 แกลบ

ในแกลบ (100 กรัม) มีองค์ประกอบที่สำคัญ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบของแกลบใน 100 กรัม

องค์ประกอบ	ปริมาณ(ร้อยละ)
เซลลูโลส	35
เฮมิเซลลูโลส	25
ลิกนิน	20
โปรตีน	3
เถ้า (ซิลิก้า)	17

(ที่มา: http://www.unu.edu/unupress/unupbooks/80362e/80362E05.htm)