บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผลงานวิจัยที่ผ่านมา

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์และคณะ 2551 พบว่า เอนไซม์จากไตรโคเดอร์มา รีสิอี (*Trichoderma reesei*) RMUTT01 ร่วมกับแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี (*Saccharomyces cerevisiae*) สามารถนำไปใช้หมักกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล ที่ pH ประมาณ 5 และอุณหภูมิห้อง เอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 2 g/L หรือคิดเป็น 63 ลิตรต่อตันกากมันสำปะหลัง จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดที่ใช้ในงานวิจัยเป็นเชื้อเดี่ยวได้จากการเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อพีดีเอและวายเอ็มเอตามลำดับ ไตรโคเดอร์มา รีสิอี เติบโตและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสภายใต้สภาวะการใช้อากาศ ขณะที่ในขั้นตอนการหมักเอทานอลจากกากมันสำปะหลังใช้เชื้อราชนิดนี้ร่วมกับยีสต์ซึ่งไม่ต้องการอากาศในระบบ แต่เชื้อราชนิดนี้อยู่ร่วมกับยีสต์เพื่อใช้ผลิตเอทานอลได้ การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังต้องใช้กระบวนการ 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่หนึ่งการเตรียมเซลลูโลสจากฟางข้าวให้บริสุทธิ์ ขั้นตอนที่สองการผลิตครูดเอนไซม์จากเซลลูโลสจากไตรโคเดอร์มา รีสิอี RMUTT01 และขั้นตอนที่สามการหมักเอทานอลจากกากมันสำปะหลังด้วยครูดเอนไซม์ร่วมกับแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี นอกจากนั้นได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบเอทานอลที่หมักได้จาก 4 ขั้นตอน ขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นคือขั้นตอนการย่อยสลายกากมันสำปะหลังด้วยครูดเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อนจึงนำน้ำหมักที่ได้หมักเอทานอลด้วยยีสต์ โดยที่แต่ละขั้นตอนใช้จุลินทรีย์เดี่ยวๆ พบว่าเอทานอลที่ได้ 2.7 g/L หรือคิดเป็น 86 ลิตรต่อตันกากมันสำปะหลัง ใช้เวลาหมักนาน 4 วัน [2]

Natesan Balasubramanian และ Damodaran Lalithakumari 2008 [3] ได้ศึกษาวิจัยคุณลักษณะของโปรโตพลาสต์ inter, intra-fusant และ regeneration ของเชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม (*Trichoderma harzianum*) และไตรโคเดอร์มา วิไรด์ (*Trichoderma viride)* พบว่าโปรโตพลาสต์ของไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัมและไตรโคเดอร์มา วิไรด์เท่ากับ ได้ 9.37×10^{5} โปรโตพลาสต์/mL และ 11.1×10^{5} โปรโตพลาสต์/mL ที่อายุ 16 และ 14 ชั่วโมงของการเพาะเชื้อ ตามลำดับ ความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้น ที่ pH 5.5 และ 28 ^{o}C

Kabbashi และคณะ 2007 [4] ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากทะลายปาล์มด้วยการหมักแห้งโดยใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่างไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม (*Trichoderma harzianum*) และแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี ทำการหมักในขั้นตอนเดียว เอทานอลที่ได้เท่ากับ 14 % v/v ใช้เวลาหมัก 1 วัน ที่ pH 7 เปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 60 (v/w)

Humphrey. C. Nzelibe และ Caritas U Okafoagu 2007 [5] ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลที่สภาวะเหมาะสมจากของเสียโรงงานเยื่อ Garcinia kola (bitter kola) โดยใช้เชื้อรา Aspergillus niger

ย่อยสลายให้ได้น้ำตาลเปรียบเทียบกับการย่อยสลายด้วยกรดและด่าง แล้วจึงใช้ยีสต์ที่ใช้ทำขนมปังเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล

Saloheimo Anu 2004 [6] ได้รายงานการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเครื่องมือในการทำโคลนนิ่งและการวิเคราะห์ยีนส์ของเชื้อราเพื่อนำไปใช้สำหรับการย่อยสลายชีวมวลและการใช้ประโยชน์

B. S. Dien. M. A. Cotta และ T. W. Jeffries 2003 [7] ได้นำเสนอแบกทีเรียต่างๆ ที่นำความรู้ทางวิศวพันธุกรรมมาใช้สำหรับการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสซึ่งอยู่ในชีวมวลเพื่อพลังงาน ได้แก่ Engineering *E. coli*, *Z. mobilis*, K. *oxytoca* และ *Erwina chrysanthemi*

Hunsa Punnapayak และคณะ 1999 [8] ได้ศึกษาการหมักเอทานอลจากเส้นใยของ *Agave sisalana* ในอาหารเหลวแบบรวมปฏิกิริยาระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RMUTT01 ร่วมกับแซคคา--โรมายซิส ซิรีวิสิอี ให้ผลได้ของเอทานอล 0.3 กรัมต่อกรัม ใช้เวลาหมัก 3 วัน

Srinivas R. และ T Panda 1998 [9] ได้ศึกษาผลของ pH และความเสถียรเชิงความร้อนของ carboxymethyl cellulose จาก intergeneric fusants ของไตรโคเดอร์มา รีสิอี RMUTT01 ร่วมกับแซคคาโรมายซิส ซิรีวิสิอี เปรียบเทียบกับไตรโคเดอร์มา รีสิอี QM 9414 พบว่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ผสมคือ pH 5.7 และ 41.7 ^{o}C

2.2 หลักการทั่วไปของกระบวนการหมักแข็ง ในเทคโนโลยีชีวภาพ [10]

การหมักแข็ง (solid-tate fermentation, S-SF) คือการเติบโตและเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์บนวัสดุของแข็งที่มีความชื้นในที่ไม่ใช่น้ำ ระบบ จุลินทรีย์ต้องการน้ำในการเติบโตซึ่งได้น้ำจากความชื้นที่อยู่ในสับสเตรทของระบบ S-SF ศัพท์เทคนิคอื่นที่ใช้แทน S-SF เช่น solid phase fermentation, solid-state cultivation, solid substrate fermentation และ moist solids fermentation

ส่วนใหญ่กระบวนการ S-SF จุลินทรีย์เติบโตโดยใช้อากาศจึงเป็นการหมักแข็งแบบแอโรบิก ตัวอย่างของ SSF ที่เราคุ้นเคยกันดี มีดังนี้คือ

- การทำปุ๋ยหมักโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร หรือผลิตภัณฑ์ข้างเคียง จุลินทรีย์เติบโตได้โดยใช้สารอาหารที่มีอยู่ในของเหลือทิ้ง ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น (60-70^{o}C) อุณหภูมิลดลงเมื่อสารอาหารถูกใช้ในการย่อยสลายหมดไป
- การทำเต้าหู้ ใช้เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* เพาะเลี้ยงบนถั่วเหลืองสุก ภายใน 24 ชั่วโมง เชื้อราทำให้ถั่วรวมตัวเป็นก้อนเต้าหู้
- การทำซอสถั่วเหลือง ใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* เพาะเลี้ยงบนถั่วเหลืองสุกและปล่อยให้เติบโตประมาณ 2 วัน ระหว่างนี้เชื้อราจะผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยสลาย

กระบวนการ S-SF ทั่วไป มีดังนี้

- จุดเริ่มต้นของสับสเตรทมาจากทางการเกษตร เช่น ข้าว ธัญพืช มันสำปะหลัง ข้าวโพด หรือผลิตภัณฑ์ข้างเคียง เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด
- ทำการเตรียมสับสเตรทก่อนหรือการปรับสภาพสับสเตรท การลดขนาดด้วยการหั่นหรือบดเป็นชิ้นเล็กๆ การทำให้แตกสลาย การย่อยสลายด้วยสารเคมีหรือความร้อนหรือการกำจัดลิกนินเพื่อช่วยทำให้โมเลกุลขนาดใหญ่ ย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น
- แหล่งคาร์บอน มักเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น แป้ง หรือเซลลูโลส รวมทั้งสับสเตรทของแข็งที่มีน้ำตาลละลายได้อยู่ในปริมาณหนึ่ง
- จุลินทรีย์ ส่วนใหญ่คือเชื้อรา เพราะเลี้ยงเชื้อง่ายและแข็งแรง
- สับสเตรทถูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและใส่ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
- ถังปฏิกรณ์ชีวภาพอาจจะมีหรือไม่มีการกวนและเติมอากาศ
- กระบวนการที่สมบูรณ์ สับสเตรทที่ถูกหมักประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ในกรณีที่เป็นอาหาร แต่ผลิตภัณฑ์อื่นๆ อาจจะถูกชะออกมาและต้องนำไปผ่านกระบวนการแยกต่อไป เช่นการกลั่นเอทานอล

การเติบโตของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักแข็ง มีดังนี้

- สปอร์ของเชื้อราเริ่มแตกเพื่อเกิดเป็นเส้นใยหรือมายซีเลียซึ่งแผ่ออกไปบนผิวของสับสเตรทที่มีอยู่ เมื่อโคโลนีเติบโตบนผิวต่อไปเรื่อยๆ ความหนาแน่น หรือความหนาของมายซีเลียมเพิ่มขึ้น
- ไฮฟีที่ต้องการอากาศจะงอกขึ้นระหว่างช่องว่างของอนุภาค
- ไฮฟีสามารถไชเข้าสับสเตรทได้
- ไฮฟีที่ปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ อาจอยู่ในรูปของเซลล์ที่ล้อมรอบหรือเซลล์อิสระ เซลล์เหล่านี้จะแพร่เข้าสู่สับสเตรท
- เอนไซม์ย่อยสลายโมเลกุลใหญ่ เช่นแป้ง ไปเป็นโมโนเมอร์ (โมเลกุลเล็กที่สุด เช่น กลูโคส) ซึ่งมีอิสระในการแพร่
- โมโนเมอร์แพร่ผ่านเข้าไปในสับสเตรทและให้ไฮฟีของเชื้อรานำไปใช้
- ในระหว่างขั้นตอนการเติบโตต่างๆ ปริมาณของสับสเตรทที่เชื้อราสามารถเข้าถึงอาจจะเพิ่มขึ้น คงที่หรือลดลงได้ในกระบวนการปลดปล่อยเอนไซม์และการย่อยสลาย
- การไหลของออกซิเจนหรือการแพร่ (ขึ้นกับใช้หรือไม่ใช้การเติมอากาศ) ผ่านช่องว่างระหว่างอนุภาค ออกซิเจนละลายในฟิล์มของของเหลวที่ติดกับผิวของสับสเตรทและชีวมวลหรือเซลล์นำออกซิเจนไปใช้ การเติบโตส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ผิวของอนุภาคเพราะว่ามีออกซิเจนที่จะนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว

- ความร้อนที่เกิดขึ้นโดยเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ และถูกนำออกไปโดยการพาความร้อน การนำ และการระเหย (ความสัมพันธ์ที่สำคัญของกลไกเหล่านี้ขึ้นกับการออกแบบถัง ปฏิกรณ์และการดำเนินการ)

2.3 จุลินทรีย์และสับสเตรทต่างๆ ในกระบวนการหมักแข็ง [10]

2.3.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดใช้ในกระบวนการหมักแข็ง มี 3 ชนิด คือ ยีสต์ แบคทีเรีย และ ราชนิดเส้นใย ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ยีสต์ ปกติเติบโตบนสับสเตรทเพียงเล็กน้อย การหมักแข็งด้วยยีสต์ไม่ใช้อากาศ (ensiling) กับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่ 60-70 % ความชื้น บรรจุให้แน่นปราศจากอากาศ และหมักที่อุณหภูมิห้อง (25-30^{o}C) เป็นเวลาหนึ่งถึงสองสัปดาห์ ยีสต์ถูกพบระหว่างขั้นตอนเริ่มต้นของการหมัก และจะเกิดแบคทีเรียชนิดแลกโตแบซิลไล (lactobacilli) แทนที่

แบคทีเรียมีบทบาทในกระบวนการหมักแข็งต่างๆ เป็นได้ทั้งจุลินทรีย์หลักและรอง แบคทีเรียชนิดแลกโตแบซิลไล เป็นจุลินทรีย์หลักระหว่างการหมักยีสต์ เทอร์โมฟิลิค แบคทีเรีย มีบทบาทเด่นระหว่างการทำปุ๋ย ก่อนการเกิดของเทอร์โมฟิลิค แอคทิโนมายซีส และรา การผลิตอาหารหมักดองในอาเซียนใช้วิธีการแบบดั้งเดิม ทั้งการเตรียมเลี้ยงเชื้อและการหมักทำภายใต้สภาวะการทำให้ปลอดเชื้อแบคทีเรียอาจจะเข้าไปปนเปื้อนได้

ราที่เป็นเส้นใย เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สำคัญสำหรับกระบวนการหมักแข็ง และในตอนต่อไปนี้จะกล่าวถึงราและสมบัติของราที่ใช้ในการหมัก ราที่ใช้มีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus*, *Rhizopus* รา ที่ย่อยสลายเส้นใย (cellulolytic fungi) เช่น *Chaetonium cellulolyticum* และ *Trichoderma reesei* ราที่ย่อยสลายลิกนิน เช่น ราขาว-เน่า (white-rot fungi) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักด้วยราเหล่านี้มีมากมายหลายชนิด ราเส้นใยเหมาะสำหรับการหมักแข็ง เนื่องจากการเติบโตของไฮฟาสามารถเดินและทะลุทะลวงบนสับสเตรทได้ดี

ราเส้นใยปรับตัวเพื่อแผ่ขยายไปเหนือและแทงเข้าไปในสับสเตรทของแข็งได้เป็นอย่างดี บนผิวสับสเตรทของแข็ง ราผลิตโคโลนีมากมายแผ่ขยายอย่างรวดเร็วเนื่องจากการขยายไอฟีที่ขอบนอกของโคโลนี ในการหมักแข็ง โคโลนีเกิดขึ้นจากสปอร์ใกล้เคียงรวมตัวกัน ทำให้ความหนาแน่นของไฮฟีภายในมายซีเลียมเพิ่มขึ้น ความหนาแน่นของไฮฟีภายในโคโลนีขึ้นกับความถี่ของกิ่งก้านไฮฟี ซึ่งเป็นผลมาจากหลายปัจจัยรวมทั้งสารอาหารด้วย ไฮฟีราสามารถขยายไปยังพื้นที่ผิวใหม่ของสับสแตรทเพื่อสร้างโคโลนีได้ หรือข้ามพื้นที่จากแหล่งอาหารน้อย การเป็นเช่นนี้ได้แปรผันจากสายพันธุ์หนึ่งไปยังสายพันธุ์หนึ่ง

การเติบโตของไฮฟีทำให้รามีกำลังในการแทงทะลุสับสเตรทได้สูงกว่าจุลินทรีย์เซลล์เดียว (unicellular microorganisms) สารอาหารภายในในตอนเริ่มต้นอาจจะยังไม่ได้ใช้ แต่ภายหลังถูกใช้ได้

โดยไฮฟีที่แทงทะลุเข้าไป ผนังเซลล์ของพืช เป็นตัวกั้นการแทงทะลุ ราบางชนิดจำเป็นต้องทำให้เซลล์สับสเตรทแตกก่อน ยกเว้น ราจำพวกย่อยสลายเส้นใย เพราะว่าผนังเซลล์ด้านในยอมให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ การเติบโตของราบนลิกโนเซลลูโลสิก สับสเตรท (lignocellulosic substrates) การแทงทะลุเป็นได้ทางกลและเอนไซม์ ผนังเซลล์แข็งกันยอดแหลมไฮฟีและระบบซับซ้อนของกิ่งก้านสาขาทำให้แน่ใจว่า ไฮฟีส่วนที่แก่กว่าถูกยึดในสับสเตรท ความสามารถของยอดนี้ขยายภายใต้ความกดดัน ราที่ดีที่สุดสามารถแทงทะลุเข้าไปในเซลลูโลสิก สับสเตรทคือ ราขาว-เน่า และราน้ำตาล-เน่า (brown-rot fungi) ราทั้งสองมีเอนไซม์ช่วยขับเคลื่อนการแทง ราขาว-เน่าใช้ทั้งลิกนินและโพลิแซคคาไรด์ ขณะที่ราน้ำตาล-เน่าย่อยโพลิแซคคาไรด์และกำจัดลิกนินได้น้อย ราทั้งสองยับยั้งเซลล์ ลูมินาและแทงทะลุจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง ทำให้เป็นหลุมจากการเจาะของเอนไซม์ การเกิดหลุมนี้ต้องการให้ผนังเซลล์ด้านในสัมผัสกับยอดของไฮฟีให้ใกล้เพียงพอ ที่ตำแหน่งนี้คือระบบเซลลูเลส (cellulase system) ดังนั้น การย่อยสลายเซลลูโลสเกิดขึ้นมากในหลุมที่ถูกเจาะ เซลล์ในลูมินาปล่อยเซลลูเลสซึ่งเป็นสาเหตุของการย่อยสลายที่ผิวด้านในของผนังเซลล์ เมื่อไฮฟีสัมผัสผนังเซลล์จะเกิดการย่อยสลายมากยิ่งขึ้น (ทำให้กลวงและพังทลาย) ชี้ให้เห็นว่าการย่อยสลายเริ่มต้นของเซลลูโลสเกิดใกล้กับผิวของไฮฟีรามากๆ ในระบบนี้ การย่อยสลายของสับสตรทต้องให้มายซีเลียมสัมผัสกันมากๆ ทำให้การแทงทะลุสำคัญมาก

ข้อดีของการแทงทะลุคือไฮฟีได้เข้าไปอยู่ใกล้ชิดกันกับสารอาหารภายใน ระยะทางที่ใช้ในการแพร่ลดลง สิ่งนี้สำคัญที่สุดระหว่างขั้นตอนของการหมักต่อมาเมื่อสารอาหารที่ผิวสับสเตรทหมด

ไฮฟีแทงทะลุได้เป็นไฮฟีที่หาอาหาร (nutrient-searching hyphae) ไฮฟีนี้จะไม่ดูดซับอาหารและถ่ายโอนอาหารกลับไปยังมายซีเลียมที่ผิว เพราะทรานส์โลเคชัน (translocation) ของรามีทิศทางเดียว จากมายซีเลียมแก่กว่าไปยังยอดที่กำลังเติบโต การเติบโตของมายซีเลียมภายในสับสเตรทของแข็งเกิดขึ้นอย่างรุนแรง เมื่อใช้ออกซิเจนที่ผิวอย่างมากที่สุด ออกซิเจนจึงมีความสำคัญ

ความสามารถทางกายภาพของราเส้นใยในการหมักแข็ง ราเส้นใยเติบโตได้ดีในที่มีน้ำน้อยและที่พีเอชมีค่าต่ำ ใน S-SF บางระบบใช้แอคทิวิตีของน้ำและพีเอชต่ำๆ ร่วมกันเพื่อที่จะสร้างสภาพแวดล้อมซึ่งราชอบที่จะเติบโตและป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียและยีสต์

ราเส้นใยหลายสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ที่พบในสับสเตรทของแข็งได้ในช่วงกว้าง เอนไซม์ที่สำคัญที่สุดสำหรับการเติบโตบนสับสเตรทของแข็งจากแหล่งเกษตรกรรม คือ อามายเลส (amylases) และเซลลูเลส (cellulases) ถึงแม้ว่า โปรตีเอส (proteases) และไลเปส (lipases) ช่วยในการย่อยสลายและแทงทะลุ ราส่วนใหญ่ผลิตสปอร์ การเพาะเลี้ยงสปอร์ทำได้ง่ายและสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นช่วงเวลานาน สิ่งนี้ทำให้กระบวนการที่ใช้เชื้อรามีความยืดหยุ่นกว่าเชื้ออื่น เพราะการเพาะเลี้ยงเป็นหัวใจของการผลิตเชื้อราสำหรับใช้ในกระบวนการหมัก

การเพาะเลี้ยง (inoculum) ในการหมักแข็งเป็นสิ่งสำคัญอีกอย่างหนึ่ง การเพาะเลี้ยงสปอร์ราไม่ได้ผลดีที่สุดเสมอไป ถึงแม้ว่าจะสะดวกในการนำไปใช้ การเพาะเลี้ยงสปอร์ขึ้นกับการเตรียมการหมัก สปอร์อยู่ได้นานกว่าฟังกอล มายซีเลีย (fungal mycelia) และสามารถเก็บไว้และนำมาใช้เมื่อ

ต้องการ สปอร์อ่อนแอน้อยกว่ามาซีเลียในระหว่างการเก็บและการเพาะเลี้ยงด้วยเช่นกัน ข้อเสียของสปอร์อย่างหนึ่งคือ การเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์อยู่นิ่ง ช่วงของการแตกสปอร์ต้องใช้เวลานานหลายชั่วโมง จึงควรนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทันทีก่อนนำไปใช้หมัก

การเพาะเลี้ยงราบนอาหารแข็งจะดีกว่าในอาหารเหลว ถึงแม้ว่าการเลี้ยงในของเหลวจะง่ายกว่า อย่างไรก็ตาม การเพาะสปอร์ลงในอาหารเหลวทำได้ง่ายโดยใช้การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งมาก่อน สปอร์จะแขวนลอยในอาหารเหลวและแยกสปอร์ได้ก่อนตามต้องการ

การใช้เชื้อสดจะทำให้ลดการปนเปื้อนที่จะเกิดขึ้นในระหว่างการหมักได้ สิ่งนี้สำคัญสำหรับระบบที่ไม่ต้องป้องกันการปนเปื้อนเป็นกรณีพิเศษ

บางครั้งความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการเติบโตใน S-SF อย่างมีนัยสำคัญ แต่ในกรณีอื่นๆ กระบวนการดำเนินไปได้ ถึงแม้ความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้นจะมีค่าในช่วงกว้างก็ตาม ความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้นที่นำไปใช้มีค่าในช่วงกว้าง จาก 10^4 ถึง 10^7 สปอร์ต่อกรัมของสับสเตรท ขึ้นกับเชื้อที่ใช้ ขนาดของเชื้อที่นำมาใช้ต้องมีค่ามากพอและการผสมเริ่มต้นเพียงพอเพื่อให้แน่ใจว่าอนุภาคสับสเตรทเกือบทั้งหมดจะถูกหุ้มด้วยโคโลนีจึงจะให้ผลที่ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นของสปอร์มากเกินไปจะทำให้การเริ่มแตกสปอร์ช้า

2.3.2 การปลูกถ่ายเชื้อ

ขึ้นกับสายพันธุ์และการทำให้ปลอดเชื้อ แบ่งออกเป็น

- การปลูกถ่ายเชื้อเดี่ยว (monoculture) คือการนำเชื้อบริสุทธิ์เลี้ยงในสับสเตรทที่ทำให้ปลอดเชื้อก่อนโดยการพลาสเจอร์ไรซ์หรือสเตอริไรซ์ ในระหว่างการหมักเพื่อป้องกันการปนเปื้อนอาจจะต้องใช้กระบวนการปลอดเชื้อ (aseptic procedures) ในบางกรณีต้องเลือกสภาวะระหว่างการปนเปื้อนกับการเติบโตของเชื้อที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว

- การปลูกถ่ายเชื้อผสม (defined mixed culture) คือการนำเชื้อเดี่ยวมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์เลี้ยงบนสับสเตรทที่ผ่านการสเตอริไรซ์หรือพลาสเจอร์ไรซ์แล้ว สิ่งนี้เป็นการนำสับสเตรทมาใช้ประโยชน์และสายพันธุ์ต่างๆ สามารถได้ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เช่น เชื้อผสมของ *Trichoderma reesei* [10] (Viesturs et al., 1981) หรือ *Chaetomium cellulolyticum* [10] และ [11] (Tengerdy et al., 1983) กับ *Candida lipolytica* พบว่าเพิ่มการผลิตโปรตีนจากการใช้ฟางข้าวสาลี เพราะว่า ยีสต์ใช้กลูโคสและป้องกันการควบคุมการใช้พลังงานของเอนไซม์จากเชื้อรา

- การปลูกถ่ายเชื้อซีเควนเชียล (sequential culture) เป็นเชื้อผสมที่ปลูกถ่ายจุลินทรีย์ชนิดที่สองลงไปหลังจากจุลินทรีย์ชนิดแรกหยุดการเติบโต วิธีการนี้สามารถนำไปใช้เพื่อการใช้สารอาหารในสับสเตรทได้สูงสุด เช่น ส่วนประกอบของโปรตีนในการหมักฟางข้าวสาลีโดยใช้ *Chaetomium cellulolyticum* หรือ *Trichoderma reesei* สามารถนำไปใช้ได้มากขึ้นโดยปลูกถ่ายเชื้อยีสต์ *Candida utilis* ลงไปหลังจาก 72 ชั่วโมง ที่เวลานี้ เชื้อราหยุดเติบโตแต่ไม่ใช้น้ำตาลทุกชนิด น้ำตาลที่มากเกินพอเป็นสับสเตรทให้ยีสต์เติบโต การเติม *Candida utilis* ที่ตอนเริ่มต้นของการหมักจะมีประสิทธิภาพน้อย

กว่า เพราะว่ายีสต์ต้องแข่งขันกับราเพื่อแย่งน้ำตาล ทำให้หน่วงการเติบโตและการผลิตเซลลูเลสของเชื้อรา วิธีการปลูกถ่ายเชื้อแบบนี้ใช้ผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสของฟางข้าวและรำข้าวสาลีโดย Shamala & Sreekantiah (1987) [12] สกัดเอนไซม์ออกหลังจากการหมักเริ่มต้นด้วยน้ำ ทำกากของแข็งที่เหลือให้แห้ง ใส่อาหารเหลวใหม่อีกครั้งและเพาะเลี้ยงซ้ำ เชื้อราสามารถเติบโตได้บนสับสเตรทเดิม 5 ครั้ง ทำให้ผลได้ของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้น

- การปลูกถ่ายเชื้อผสมอื่นๆ เป็นชนิดของการเพาะเลี้ยงเชื้อธรรมชาติบนสับสเตรท หรือการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมแบบดั้งเดิม ซึ่งอาศัยการหมักจากเชื้อที่อยู่ในอากาศ เช่น การทำอาหารหมักดอง การบำบัดน้ำเสีย

2.3.3 สับสเตรท

ประกอบด้วยอนุภาคที่เปียก มีช่องว่างระหว่างอนุภาคของแข็งเพื่อการถ่ายเทอากาศหรือก๊าซต่างๆ ระบบการหมักเป็นแบบเนื้อผสม ไม่ใช่เนื้อเดียวเหมือนการหมักเหลว การเติบโตส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ผิว เป็นสาเหตุของการเกิดเกรเดียนท์ของสารอาหารขึ้นภายในอนุภาคของแข็งออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ภายในวัฏภาคก๊าซ จึงทำให้การศึกษายากยิ่งขึ้น สับสเตรทส่วนใหญ่ได้จากวัสดุทางการเกษตร ของเหลือทิ้งขนาดใหญ่ผ่านการตัดและบด ปัญหาของการเป็นเนื้อผสม คือ

- ส่วนของพืช เช่น ลำต้น ใบ ราก ซึ่งมีโครงสร้างซับซ้อน ต้องการการลดขนาดอนุภาคก่อนการหมักแข็ง พืชชนิดเดียวกันจากแหล่งต่างกันองค์ประกอบและโครงสร้างแตกต่างกัน
- อนุภาคสับสเตรทมีมีโครงสร้างซับซ้อน เช่น เป็นเม็ด ลำต้นเป็นชิ้นเล็กๆ
- คุณภาพและองค์ประกอบของสับสเตรทอาจจะแตกต่างกันแบทซ์ต่อแบทซ์ เพราะพืชเติบโตจากแหล่งต่างกัน ยีนส์จะแตกต่างกันไปด้วย ผลของการเก็บเกี่ยวที่สภาวะแตกต่างกันทำให้องค์ประกอบแปรผัน
- การปรับสภาพก่อนการหมัก เช่น เจลาไทเซชัน (gelatization) การแตกสลายบริเวณผลึกเซลลูโลส ทำให้เชื้อใช้สับสเตรทได้ดีมากยิ่งขึ้นส่งผลต่อการเติบโตตามมา
- การกวนผสมสับสเตรทของแข็งทำได้ยากระหว่างการหมัก

สับสเตรทที่ใช้ในการหมักแข็ง แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่

- แป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก
- เซลลูโลสหรือลิกโนเซลลูโลส เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก
- น้ำตาลละลายได้เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

สมบัติของอนุภาคสับสเตรท สมบัติทางกายภาพที่สำคัญที่สุดคือ ขนาดอนุภาค ซึ่งส่งผลต่ออัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของสับสเตรท เพราะว่าจุลินทรีย์ได้ปลูกถ่ายลงบนผิวอนุภาค เพราะฉะนั้นเชื้อเริ่มต้นปะทะโดนสับสเตรท ขนาดอนุภาคมีผลต่อช่องว่างระหว่างอนุภาคด้วย เส้นใยเชื้อราเติมเต็มช่องว่างขนาดเล็กอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ขัดขวางการแพร่ ทำให้ความดันลดในระบบเติม

อากาศ ขนาดอนุภาคที่เหมาะสม ทำให้การใช้สารอาหารและออกซิเจนได้ดี ขนาดอนุภาคที่ใช้ในการหมักแข็งน้อยกว่า 1 มิลลิเมตรถึงประมาณ 1 เซ็นติเมตร

สับสเตรทแป้ง จุลินทรีย์ที่ใช้หมักแป้งได้ ต้องใช้เอนไซม์อะมายเลสร่วมกับกลูโคอะมายเลสทำการย่อยแป้งก่อน สับสเตรทแป้งที่ใช้ในการหมักแข็ง เช่น ข้าวเจ้า มันสำปะหลัง รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งกล้วย มันฝรั่ง สับสเตรทเหล่านี้มีสารอาหารสมบูรณ์สำหรับการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (ข้าว) บางสับสเตรทต้องมีอาหารเสริม เช่น แหล่ง ไนโตรเจนที่ต้องเติมให้กับมันสำปะหลัง ผลผลิตจากสับสเตรทแป้งประกอบด้วยโปรตีนสูงสำหรับอาหารสัตว์ สปอร์ของเชื้อราสำหรับนำไปใช้เพาะเลี้ยงได้ต่อไปอีก กรดซิตริก พิกเม้นท์ สารปฏิชีวนะ และสารเมทาบอไลท์อันดับที่สอง สับสเตรทแป้ง อาจจะต้องทำการปรับสภาพก่อน เช่น

- การต้มหรือการนึ่งด้วยไอน้ำ
- การบด หั่น ตัด ลดขนาด
- ทำให้เป็นก้อนเล็กๆ
- ทำให้แตก

ปัญหาอีกอย่างของสับสเตรทแป้งคือความเหนียว จะทำให้สับสเตรทรวมตัวเป็นก้อนใหญ่ขึ้นระหว่างการหมักแข็ง โดยเฉพาะการกวนสับสเตรท ทำให้ขาดอากาศ เชื้อตายได้

สับสเตรทเซลลูโลสิก กระบวนการต่างๆ มากมายที่นำมาใช้ในการหมักของแข็งเซลลูโล-สิกสับสเตรท เช่น ฟางข้าว เยื่อของซูการ์บีท รำข้าวสาลี และไม้ บางกระบวนการต้องการย่อยวัสดุเซลลูโลสและการผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส การย่อยสลายเซลลูโลสอย่างมีประสิทธิภาพต้องการเอนไซม์หลายตัว ส่วนใหญ่การศึกษาเน้นไปที่การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสเพื่อเพิ่มโปรตีนของสับสเตรทเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ หรือเพื่อผลิตเซลลูเลสหรือเอนไซม์ย่อยสลายด้วยน้ำ กระบวนการอื่นๆ มีจุดประสงค์เพื่อย่อยสลายลิกนิน เพื่อให้ย่อยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสได้ง่ายยิ่งขึ้น และเพิ่มการย่อยลิกโนเซลลูโลสิกในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ลิกนิน เปอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายลิกนิน ลิกนินไม่มีบทบาทใดๆ สำหรับแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เชื้อราจึงย่อยเฉพาะเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

สับสเตรทประเภทลิกโนเซลลูโลสิก ต้องมีการปรับสภาพก่อนนำไปย่อยสลายเพื่อแยกโมเลกุลของเซลลูโลสออกจากลิกนินที่อยู่ภายในสับสเตรท หลังจากนั้นทำการบดสับสเตตรทให้มีขนาดอนุภาค 1 ถึง 2 มิลลิเมตร เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวให้เชื้อจุลินทรีย์เกาะและทำลายผนังเซลล์ การทำลายโครงสร้างเซลลูโลสผลึกอาจใช้การให้ไอน้ำภายใต้ความดัน บางครั้งให้ไอร้ำพร้อมไปกับการใช้สารเคมีปรับสภาพ

สับสเตรทกับน้ำตาลละลายได้ สับสเตรทของแข็งประกอบด้วยปริมาณของน้ำตาลละลายได้อย่างมีนัยสำคัญ เช่น กากองุ่นที่ผ่านการคั้นน้ำแล้ว ข้าวฟ่างหวาน ซูการ์บีท กากสับปะรด กากกาแฟ

ชานอ้อย สับสเตรทเหล่านี้นำมาผ่านกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล กรดซิตริก และโปรตีนเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์

2.4 ปัจจัยทางกายภาพควบคุมการเติบโตในการหมักแข็ง

พารามิเตอร์ที่มีผลกระทบอย่างสำคัญต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ในการหมักแข็ง คือ น้ำที่เพียงพอ พีเอช อุณหภูมิ อากาศที่แวดล้อม ความเข้มข้นของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ [10] และ [13] มีรายละเอียดดังนี้

2.4.1 ความชื้นที่ต้องการ

ความชื้นที่ต้องการในการหมักแข็งแสดงด้วยปริมาณน้ำหรือกิจกรรมของน้ำ (water activity, a_w) ของสับสเตรทของแข็ง กิจกรรมของน้ำส่งผลโดยตรงต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ แต่การวัดเป็นปริมาณน้ำทำได้ง่ายกว่า ปริมาณน้ำบอกเป็นร้อยละของน้ำที่อยู่ในวัสดุ ส่วนกิจกรรมของน้ำ คือ อัตราส่วนของความดันไอน้ำของวัสดุกับความดันไอของน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิเดียวกัน กิจกรรมของน้ำอาจจะใช้เป็น สัดส่วนของโมเลกุลน้ำในระบบซึ่งมีสมบัติของน้ำบริสุทธิ์ ที่จุลินทรีย์ต้องการ ผลของความดันออสโมติกต่อตัวถูกละลายภายในสับสเตรท เนื่องจากคาปิลารีและแรงตึงผิว ทำให้จุลินทรีย์ได้รับน้ำน้อยลงในการหมักแข็ง

ชนิดของสับสเตรทที่แตกต่างกัน ความจุของน้ำแตกต่างกัน ปริมาณน้ำที่สับสเตรทอุ้มไว้ได้จึงแปรผันอย่างเห็นได้ชัด ปริมาณน้ำแปรผันจาก 30 ถึง 80 % ความสัมพันธ์ระหว่าง a_w และในการหมักแข็ง ปริมาณน้ำของสับสเตรทของแข็งส่วนใหญ่ ไม่เป็นสมการเส้นตรง ปริมาณน้ำเปลี่ยนแปลงมาก แต่ a_w เปลี่ยนแปลงน้อย ปริมาณน้ำที่ต้องการมีความสำคัญ ถ้าน้อยเกินไป เชื้อจุลินทรีย์ไม่เติบโต หรือโตได้ไม่ดี ถ้ามีในสับสเตรทมากเกินไปจะทำให้เหนียว รวมกันเป็นกลุ่มก้อน หรือช่องว่างระหว่างอนุภาคมีน้ำเต็มทำให้อากาศแทรกเข้าไปไม่ได้ [14]

2.4.2 ผลของความชื้นในการหมักแข็ง

ในการหมักแข็งความชื้นที่ต้องใช้มีผลต่อการเติบโตและการเผาผลาญของจุลินทรีย์ ความชื้นอิ่มตัวที่ผิวของสับสเตรทคือค่าวิกฤต เกิดเป็นฟิล์มส่งผลต่อการแพร่ของออกซิเจนไปยังจุลินทรีย์ ผลของน้ำแปรผันกับชนิดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีระดับความชื้นที่เหมาะสมแตกต่างกัน

ความชื้นที่ต้องการใช้มักจะเปลี่ยนไประหว่างการหมักเนื่องจากมีน้ำเกิดขึ้นจากการหายใจของจุลินทรีย์ การใช้น้ำในปฏิกิริยาการย่อยสลาย การย่อยสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก สับสเตรทสูญเสียน้ำไปจากการถูกออกซิไดซ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้แห้ง เกิดการระเหยหรือการควบแน่นของความชื้นเข้าสู่หรือออกไปจากวัฏภาคก๊าซ

น้ำที่ต้องใช้หาไม่ง่าย เพราะว่าปัจจัยของสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อผลของความชื้น เช่น การหมักรำข้าวสาลีด้วย *Taralomyces* sp. ปริมาณน้ำเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 60% ที่ช่วงอุณหภูมิ 45^{o}C ถึง 55^{o}C ขณะที่ 40 ^{o}C ปริมาณที่เหมาะสมเท่ากับ 70%

2.4.3 พีเอชในการหมักแข็ง

การเติบโตของจุลินทรีย์อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในพีเอชของสับสเตรท กรดเกิดจากการออกซิเดชันไม่สมบูรณ์หรือเกิดอิออนของแอมโมเนียมทำให้พีเอชลดลง เมื่อยูเรียสลายแอมโนเนียออกมาหรือเอมีนจะทำให้พีเอชสูงขึ้น พีเอชมีผลต่อกิจกรรมการเผาผลาญของจุลินทรีย์และเป็นบัฟเฟอร์ของสับสเตรทของแข็ง ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงทำให้ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ การควบคุมพีเอชของการหมักแข็งทำได้ยาก จึงต้องการจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตได้ที่พีเอชเหมาะสมในกว้าง ส่วนใหญ่เชื้อจุลินทรีย์เติบโตในช่วงพีเอช 3 ถึง 4 ดังนั้น การศึกษาจึงต้องทำการหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม แต่เนื่องจากควบคุมพีเอชได้ยาก จึงมีข้อมูลจากการศึกษาน้อยมาก ในการหมักแข็งใช้พีเอชต่ำๆ เพื่อช่วยป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการเติบโตของเชื้อภายใต้การหมักชนิดปลอดเชื้อ เช่น การผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แบคทีเรียเข้าไปปนเปื้อนได้ง่ายที่พีเอชมากกว่า 4 แต่ที่พีเอช 3.5 การปนเปื้อนจะถูกกดไว้และได้อัตราการผลิตเอทานอลที่เหมาะสม

2.4.4 อุณหภูมิในการหมักแข็ง

การเติบโตของจุลินทรีย์เกิดความร้อนจากการเผาผลาญปริมาณมาก รายงานวิจัยที่ผ่านมาความร้อนที่เกิดประมาณ 100-300 กิโลจูลต่อกิโลกรัมของสับสเตรทต่อชั่วโมง การถ่ายโอนความร้อนออกจากสับสเตรททำได้ยากเพราะเกรเดียนท์ของอุณหภูมิ ความร้อนที่เกิดทำให้เชื้อไม่เติบโตหรือตายได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมส่วนใหญ่ของเชื้ออยู่ระหว่าง 20 ^{o}C และ 40 ^{o}C การหมักแข็งด้วยเชื้อราต้องให้ความสนใจผลของอุณหภูมิ เพราะทำให้เซลล์ตายได้ อุณหภูมิส่งผลให้กิจกรรมของเชื้อแตกต่างกันออกไป เช่น อุณหภูมิเติบโตที่เหมาะสมของ *Aspergillus niger* บนแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 35 ^{o}C-45 ^{o}C ขณะที่ 45 ^{o}C ยับยั้งการงอกซึ่งไม่มีผลต่อการเติบโตของเส้นใย ผลของอุณหภูมิมีผลต่อตัวแปรอื่นได้อีกด้วย เช่น ความชื้นเริ่มต้นของสับสเตรท

2.4.5 ก๊าซต่างๆ

ก๊าซที่สนใจในการหมักแข็งคือออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ การวัดความเข้มข้นของก๊าซเป็น partial pressureในหน่วย atm ออกซิเจนต้องแพร่จากช่องว่างระหว่างอนุภาคเข้าสู่ชีวมวล และคาร์บอนไดออกไซด์ต้องแพร่จากชีวมวลไปยังช่องว่างระหว่างอนุภาค การตอบสนองของจุลินทรีย์ในการหมักแข็งต่อก๊าซขึ้นกับสายพันธุ์จุลินทรีย์และสับสเตรทที่ใช้ การผลิตเอทานอลต้องการออกซิเจนต่ำอาจจะใช้สารเคมีเติมลงไปเพื่อให้เกิดสภาวะไม่มีอากาศ

2.4.6 ความเข้มข้นของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์

สับสเตรทของแข็งที่มีปริมาณน้ำต่ำจะมีความเข้มข้นสูงสำหรับการหมักแข็งเมื่อเทียบกับการหมักเหลว ส่งผลกับสารอาหารที่ละลายน้ำจะน้อยลง หรือการย่อยสลายผลิตภัณฑ์จากโมเลกุลขนาดใหญ่ด้วยน้ำ หรือผลข้างเคียงของการเผาผลาญเกิดสะสมอยู่ในระดับยังยั้งการย่อยสลายได้

ความเข้มข้นของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์มีความสำคัญในการหมักแข็ง ในทางปฏิบัติหาเป็นปริมาณของสารต่อกรัมของของแข็ง (ทั้งของแข็งสดและแห้ง) เช่น มากกว่า 25% ของน้ำหนักแห้งของ

ของแข็งอาจสูญเสียไปและเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณเซลลูโลสของฟางข้าวสาลีเพิ่มขึ้นระหว่างการหมักแบบไม่ใช้อากาศด้วย *Chaetomium celluloticum* เพราะการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ถึงแม้ปริมาณของเซลลูโลสคงที่ ความเข้มข้นของสับสเตรทเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับน้ำหนักทั้งหมดที่ลดลง การหาสัมประสิทธิ์ผลได้และการเปลี่ยนแปลง ใช้การคำนวณจากปริมาณสัมบูรณ์ของชีวมวล หรือผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้และสับสเตรทที่ได้ใช้ไป การคำนวณไม่ควรจะหาจากความเข้มข้นเริ่มต้นและสุดท้ายต่อกรัมของสับสเตรท

2.4.7 ผลของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ในการหมักแข็ง

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเติบโตและการเผาผลาญในการหมักแข็ง เช่น การจำกัดของสารอาหาร อัตราส่วนของสารอาหารที่แตกต่างกัน การยับยั้งสับสเตรท การเผาผลาญถูกระงับ และการยับยั้งผลิตภัณฑ์ การทำหน้าที่เผาผลาญที่แตกต่างกันอาจถูกกระทบ การเติบโตอาจถูกกระตุ้นหรือจำกัด การเกิดสปอร์อาจถูกเหนี่ยวนำหรือการเผาผลาญการถูกเหนี่ยวนำหรือระงับ การหาสภาวะที่เหมาะสมของสารอาหารทำได้ยาก เพราะผลของสารอาหาร พีเอช และปริมาณน้ำ องค์ประกอบสารอาหารของสับสเตรทของแข็งอาจแปรผันจากแบทช์ต่อแบทช์ ถ้าสับสเตรทไม่มีสารอาหารทั้งหมดที่ต้องการสำหรับการเติบโต สิ่งนี้ทำให้จำเป็นต้องเติมสารอาหารระหว่างการเตรียมสับสเตรท ปกติใช้สารอาหารที่ละลายน้ำเพื่อเพิ่มความชื้นให้สับสเตรท [19]

ไนโตรเจนมีความสำคัญในการหมักแข็ง ซึ่งได้จากแหล่งไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้ระหว่างการเตรียมสับสเตรท ไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนพีเอชในสับสเตรทระหว่างการหมัก บางครั้งอยู่ในรูปของอัตราส่วน C:N