บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่ผ่านมา

2.1 การทบทวนวรรณกรรมหรือสารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ข้าวฟ่างหวานเป็นพืชที่มีลักษณะทางการเกษตรและคุณสมบัติต่าง ๆ ใกล้เคียงกับอ้อย คือ ต้นสูง 2.0-3.5 เมตร ลำต้นฉ่ำน้ำ มีปริมาณน้ำหีบได้ประมาณร้อยละ 35-40 ของน้ำหนักสดมีความหวานอยู่ระหว่าง 18-20 องศาบริกซ์ นอกจากนี้ยังมีส่วนของชาน (bagasse) แห้งประมาณร้อยละ 20-25 ของน้ำหนักสดใช้เป็นแหล่งพลังงานในโรงงานได้ดีเช่นเดียวกับชานอ้อย ซึ่งประเทศทางด้านยุโรป เช่น ฝรั่งเศส กรีซ อิตาลี สเปน หรือ อเมริกา บราซิล และจีน นิยมปลูกข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบผลิตน้ำตาลในรูปของไซรัป เอทานอล เยื่อกระดาษ อาหารสัตว์ [1] ข้าวฟ่างหวานเป็นพืชที่ทนทานต่อความแปรปรวนของสภาพดินฟ้าอากาศได้ดี [2] อายุเก็บเกี่ยว (4 เดือน) เร็วกว่าอ้อยประมาณ 6-8 เดือน ต้องการปุ๋ยและน้ำน้อยกว่าอ้อย ให้ผลผลิตต้นสดในสภาพปลูกที่อาศัยน้ำฝนเฉลี่ย 3-7 ตันต่อไร่ และ 15-20 ตันต่อไร่ในสภาพที่มีน้ำให้ สามารถไว้ตอได้เช่นเดียวกับอ้อยเก็บเกี่ยวได้ 1-3 ครั้งต่อปี ขึ้นกับสภาพของน้ำหรือความชื้นของดิน แต่ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด นอกจากส่วนของลำต้นที่สามารถใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอล ส่วนของเมล็ดที่มีแป้งประมาณร้อยละ 60-70 ก็สามารถใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลได้เช่นเดียวกับมันสำปะหลัง พันธุ์ข้าวฟ่างหวานที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ริโอ, เรย์ , เคลเลอร์และคาวเลย์ที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งจะให้ความหวานสูงสุด ในระยะเมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยาหลังเก็บเกี่ยวช่อ [3] หรือตัดต้นหลังเก็บเกี่ยวช่อ เนื่องจากน้ำข้าวฟ่างหวานสดมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในอากาศ ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราอื่น ก่อนนำเข้าขบวนการหมัก จึงควรต้องมีการศึกษาวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำข้าวฟ่างหวานที่หีบได้ให้อยู่ในรูปของน้ำเชื่อมข้น (syrup) เช่นเดียวกับกากน้ำตาล (molasse) เพื่อทยอยนำมาใช้ได้ตลอดเวลาโดยยังมีคุณภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ใช้หมัก ศัตรูพืชสำคัญที่ทำให้ผลผลิตและคุณภาพของข้าวฟ่างหวานลดลงได้แก่ โรคลำต้นเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อราและหนอนแมลงวันเจาะยอดข้าวฟ่าง ดังนั้นการพัฒนาพันธุ์ข้าวฟ่างหวานให้ได้ผลผลิตต้นสด น้ำคั้น น้ำเชื่อม และคุณภาพสูงมีความต้านทานต่อโรค แมลง เพื่อแนะนำให้เกษตรกรปลูก นอกจากจะช่วยให้มีวัตถุดิบอย่างพอเพียงในการส่งป้อนโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อลดปริมาณการใช้น้ำมันเบนซินหรือดีเซล แล้วยังส่งผลโดยตรงต่อเกษตรกรให้มีรายได้เพิ่มลดต้นทุนการผลิตเอทานอล มลภาวะเรือนกระจก และคาดว่าน้ำเสียที่เหลือจากการกลั่นเอทานอลจะมีความเป็นพิษต่อพืชและแหล่งน้ำธรรมชาติน้อยกว่าที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ

การศึกษาการคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำข้าวฟ่างหวาน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยคัดเลือกจากเชื้อยีสต์ทั้งหมด 506 พันธุ์ ที่ได้รวบรวมมาจากแหล่ง

ต่างๆ พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* AO 97 จากโรงงานน้ำตาลไทยจำกัด เป็นเชื้อยีสต์ที่เหมาะสม จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* AO 97 นั้น พบว่าไม่มีความจำเป็นต้องเติมธาตุอาหารลงในน้ำข้าวฟ่างหวานที่ใช้ในการหมักเลย เพราะมีอยู่อย่างเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ สำหรับการหมักแอลกอฮอล์อัตราการเติมกล้าเชื้อยีสต์ที่เหมาะสม คือ 3 เปอร์เซ็นต์ มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักที่ 4.5 การหมักแอลกอฮอล์จากน้ำข้าวฟ่างหวานโดยใช้ถังหมักขนาด 6 ลิตร หมักแบบกะโดยใช้อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างที่ 4.5 พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการหมักของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* AO 97 เร็วกว่า *Saccharomyces cerevisiae* Sc 90 ที่เป็นเชื้อเปรียบเทียบเล็กน้อย แต่อัตราการตายของเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* Sc 90 หลังจากที่ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดมีค่าสูงกว่าของ *Saccharomyces cerevisiae* AO 97 และได้แอลกอฮอล์ประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดที่ได้จาก *Saccharomyces cerevisiae* AO 97 สูงกว่า *Saccharomyces cerevisiae* Sc 90 ในสภาพการหมักเดียวกันและเมื่อทำการหมักที่ 40 องศาเซลเซียส ก็ได้ผลลักษณะเดียวกัน [4]

จากการเปรียบเทียบการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำข้าวฟ่างหวานที่อุณหภูมิ 35, 37 และ40 องศาเซลเซียส โดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* AO 97 พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการหมักลดลง โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการหมักถึง 28 - 40 ชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากว่า อัตราการตายของเซลล์ยีสต์สูงขึ้น นอกจากนี้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดและปริมาณเซลล์ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

การศึกษาการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณน้ำตาล 12 เปอร์เซ็นต์ ในการหมักแบบต่อเนื่องถังเดียวขนาด 6 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรด - ด่าง 4.5 และอัตราการกวน 150 รอบต่อนาทีโดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* AO 97 พบว่า Dilution rate, D เท่ากับ 0.11 hr^{-1} ได้อัตราการหมักแอลกอฮอล์สูงสุด คือ 4.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ให้ผลผลิตแอลกอฮอล์ 0.33 กรัมแอลกอฮอล์ต่อกรัมน้ำตาล และปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำส่า 39.18 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตเซลล์ 0.039 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ได้ปริมาณเซลล์ 3.5 กรัมต่อลิตร (Specific ethanol production rate) อัตราการผลิตแอลกอฮอล์จำเพาะ 1.40 กรัมแอลกอฮอล์ต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง (Specific total sugar uptake rate) อัตราการใช้น้ำตาลจำเพาะ (Cell productivity) ของยีสต์เป็น 2.85 กรัมน้ำตาลต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ที่ D = 0.11 hr^{-1} และให้อัตราการผลิตเซลล์ 0.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและต้องการ Maintenance energy coefficient (m) 0.365 กรัมน้ำตาลต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง

งานวิจัยของ [5] คือการศึกษาการเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 โดยใช้น้ำข้าวฟ่างหวานพันธุ์แคลเลอร์ พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้าวฟ่างหวานโดยมีอัตราการเจริญจำเพาะในสภาวะนิ่งเป็น 74 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลวสูตรวายเอ็ม ในการ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล ระหว่างการหมักแบบกะและแบบกึ่งต่อเนื่องในระดับขวดเขย่า โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสามระดับ คือ 18 21 และ 24 องศาบริกซ์ พบว่าการหมักแบบกะที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 24 องศาบริกซ์ให้ความเข้มข้นเอทานอล อัตราผลผลิต และผลได้สูงสุด คือ 96.53 กรัมต่อลิตร 2.53 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.44 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ และในการหมักแบบ กึ่งต่อเนื่องพบว่าการใช้เริ่มต้น 18 องศาบริกซ์ สัดส่วนการเติมน้ำหนัก 1/4 ของปริมาตรน้ำหนัก จะให้ความเข้มข้นเอทานอล 72 กรัมต่อลิตร อัตราผลผลิตและผลได้สูงสุด คือ 2.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและ0.53 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ เมื่อนำสารที่เหมาะสมมาทำการทดลอง จะพบว่าการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องให้อัตราผลผลิตและผลได้สูงกว่าแบบกะและให้ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตสั้นกว่า

งานวิจัยของ [6] ได้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* RIT02 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ในหัวเชื้อยีสต์ 2 ชนิด คือ หัวเชื้อสารละลายกากน้ำตาลซึ่งต้องเติมธาตุอาหารและแหล่งไนโตรเจน และปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 - 5.0 และหัวเชื้ออาหารเหลววายเอ็ม (สารละลายกลูโคสในยีสต์และมอลต์สกัด) ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 20 และ 2.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ *Saccharomyces cerevisiae* RIT02 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดถูกนำไปใช้ในการหมักเอทานอล ใช้เวลาหมักนาน 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* RIT02 เจริญในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่า *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารทั้ง 2 ชนิดเท่ากัน เอทานอลที่ได้จากการหมักด้วยพบว่า *Saccharomyces cerevisiae* RIT02 ที่ความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นเท่ากับ 5 มีค่ามากกว่าเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 และจากการศึกษาการเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล ซึ่งมีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 ลิตรด้วย *Saccharomyces cerevisiae* RIT02 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล และวายเอ็มในถังหมักแบบกะขนาด 20 ลิตร พบว่าเอทานอลที่ได้จากหัวเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* RIT02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลและวายเอ็มมีค่าประมาณร้อยละ 7.1 (โดยปริมาตร) ใช้เวลาหมักนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเป็น กรด-ด่างเท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

งานวิจัยของ [7] ได้ศึกษาการหมักแบบแบทช์ของสารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ที่แปรผันความเข้มข้น 4 ระดับเท่ากับร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล ที่ pH เท่ากับ 5 และอุณหภูมิห้อง (33 ^{o}C) ใช้เวลาหมักนาน 96 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือหัวเชื้อยีสต์ร้อยละ 20 โดยปริมาตรในสารละลายกากน้ำตาล อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.0485 ต่อชั่วโมง ได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก และใช้เวลาหมักนาน 40 ชั่วโมง และจากการศึกษาการหมักสารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ด้วยยีสต์เข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบต่อเนื่อง พบว่า

เอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 ของการหมักที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.1 ต่อชั่วโมง และเซลล์ยีสต์เฉลี่ยเท่ากับ 0.4335 กรัมน้ำหนักแห้ง

2.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

กรอบแนวความคิดของการวิจัยนี้คือศึกษาการผลิตและการนำข้าวฟ่างหวานมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุดในด้านพลังงานทดแทนแบบครบวงจรและลดปัญหาสภาวะโลกร้อน ข้าวฟ่างหวานที่ได้จากศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรีเป็นพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาให้มีความหวานและปลูกง่ายเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ ดังนั้น ข้าวฟ่างหวานจึงมีปริมาณและคุณภาพของน้ำตาลที่สามารถนำมาทำการหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้โดยที่ไม่ต้องปรับสภาพก่อนการหมักและไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารเพิ่ม เพราะในน้ำข้าวฟ่างหวานมีธาตุอาหารที่ยีสต์ต้องการอยู่แล้ว ดังนั้น การวิจัยนี้จึงนำน้ำข้าวฟ่างหวานมาใช้เป็นอาหารเหลวทดแทนหัวเชื้ออาหารเหลววายเอ็มซึ่งมีราคาแพง และเป็นการหมักที่อุณหภูมิห้อง จึงประหยัดค่าหัวเชื้อและพลังงานตลอดการหมัก

กระบวนการหมักที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวานเพื่อเป็นพลังงานทดแทนจะใช้ความรู้ทางด้านจุลชีววิทยา (Microbiology) ได้แก่ การเตรียมต้นเชื้อยีสต์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม การเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology) ร่วมกับกระบวนการวิศวกรรมชีวเคมี (Biochemical Engineering Process) ไปใช้ในการออกแบบกระบวนการหมักแบบกะและหาจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากการหมักน้ำข้าวฟ่างหวานโดยใช้สมการของโมนอด โดยอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของสารอาหารเดี่ยว [8] คือสมการ

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{max}} \frac{1}{C_S} + \frac{1}{\mu_{max}}$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\frac{1}{\mu}$ กับ $\frac{1}{C_S}$ จะได้รูปเส้นตรงที่มีจุดตัดแกนเอ็กซ์เท่ากับ $\frac{-1}{K_S}$ และจุดตัดแกนวายเท่ากับ $\frac{1}{\mu_{max}}$ เรียกวิธีการนี้ว่า Lineweaver - Burk plot

โดยที่ K_S = ค่าคงที่อิ่มตัว (ซึ่งเท่ากับค่าคงที่ Michaelis-Menten)

μ = อัตราจำเพาะของการเติบโต (ต่อชั่วโมง, h^{-1})

μ_{max} = อัตราจำเพาะการเติบโตสูงสุด (ต่อชั่วโมง, h^{-1})

C_S = ความเข้มข้นของสารอาหารในระหว่างการเติบโต (กรัมต่อลิตร, g/L)

2.2.1 การสังเคราะห์เอทานอลทางชีวภาพที่ได้จากการหมัก

การหมักเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลโดยยีสต์ที่ใช้ผลิตแอลกอฮอล์โดยทั่วไปได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ซึ่งสามารถเจริญได้ในน้ำ

หมักที่มีปริมาณเอทานอล 14 - 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยมีความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล ดังนี้

$$C_8H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,(C_2H_5OH) + 2CO_2$$

(180.15 g) (2x46.05 g) (2x44 g)

ทางทฤษฎี ร้อยละ 51.1 ร้อยละ 48.9

จากสมการเคมีพบว่าน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อยีสต์จะได้ เอทานอล 51.1 กรัม และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลที่สามารถใช้ได้มีเพียง 95 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นหรือคิดเป็นประสิทธิภาพการผลิตผลิตภัณฑ์จากสับสเตรท ($Y_{P/S}$) ไม่เกิน 0.485 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สำหรับ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือยีสต์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อสร้างพลังงานและสารพลอยได้ (by product) อื่นๆ [9] วิธีในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลโดยยีสต์อาศัยวิธี Embden – Meyerhof – Parnas pathway ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ และเอนไซน์ที่เกี่ยวข้องดังแสดงในตารางที่ 2.1

ข้อดีของการสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพ

ต้นทุนของวัตถุดิบมีราคาถูกเมื่อเทียบกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เพราะใช้วัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งมีราคาต่ำและมีจำนวนมากและช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่พืชผลทางการเกษตร ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น ช่วยลดขยะรักษาสิ่งแวดล้อม และผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้อื่นๆ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใช้ทำน้ำแข็งแห้ง น้ำโซดา

ข้อเสียของการสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตเอทานอลเกิดขึ้นช้ากว่าวิธีการทางเคมี ทำให้ต้องมีการดูแลเอาใจใส่มากกว่าและต้องการระบบการผลิตขนาดใหญ่หากต้องมีการปรับสภาพสารตั้งต้นให้จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ก่อนการหมักจะทำให้เกิดความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น

2.2.2 เชื้อยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก

ยีสต์เป็นกลุ่มย่อยๆของฟังไจ ซึ่งยีสต์สามารถใช้แสงแดดเป็นแหล่งพลังงานได้แต่ยีสต์มีรูปร่างที่ไม่ซับซ้อนเหมือนฟังไจชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่ยีสต์มักเป็นเซลล์เดียวขนาด เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 ไมครอน และยาวประมาณ 8 ไมครอน มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยและไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (Budding) และการแบ่งตัว (Binary fission) ในวงจรการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น เซลล์ยีสต์ชนิด Haploid สองเซลล์จะรวมตัวกันได้เป็น Diploid cell จากนั้นนิวเคลียสจะมีการแบ่งและสร้างเป็น Ascospores ซึ่งจะเติบโตเป็น Haploid cell ที่สามารถเพิ่มจำนวนโดยวิธีการ แตกหน่อหรือแบ่งตัวต่อไปได้ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเครื่องดื่มเอทานอล

ตารางที่ 2.1 ขั้นตอนและเอนไซน์ที่เกี่ยวข้องในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยยีสต์ผ่านกระบวนการ Embden – Meyerhof – Parnas pathway [9]

Step	Reaction	Enzyme
1.	Glucose + ATP $\longrightarrow$ Glucose-6-phosphate + ADP + H^+	Hexokinase
2	Glucose-6-phosphate $\longrightarrow$ Fructose-6- phosphate + ADP + H^+	Phosphoglucose isomerase
3	Fructose-6- phosphate+ ATP $\rightleftharpoons$ Fructose-1,6-bisphosphate + ADP + H^+	Phosphofructokinase
4	Fructose-1,6-bisphosphate $\rightleftharpoons$ Dihydroxyacetone phosphate + Glyceroldehyde-3- phosphate	Aldolase
5	Dihydroxyacetone phosphate $\rightleftharpoons$ Glyceroldehyde-3- phosphate	Triosephosphate isomerase
6	Glyceroldehyde-3- phosphate + Pi + NAD $\rightleftharpoons$ 1,3 – Biphosphoglycerate + NADH + H^+	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase
7	1,3 – Biphosphoglycerate+ ADP $\rightleftharpoons$ 3- phoglycerate + ATP	Phosphoglycerate Kinase
8	3- Phosphoglycerate $\rightleftharpoons$ 2- Phosphoglycerate	Phosphoglyceromutase
9	2- Phosphoglycerate $\rightleftharpoons$ Phosphoenolpyruvate + H_2O	Enolase
10	Phosphoenolpyruvate + ADP $\longrightarrow$ pyruvate + ATP	pyruvate Kinase
11	pyruvate $\longrightarrow$ Acetaldehyde + CO_2	pyruvatedecarboxylase
12	Acetaldehyde+ NADH + H^+ $\longrightarrow$ Ethanol + NAD^+	Alcohol dehydrogenase

ได้แก่ เบียร์ และไวน์ เป็นต้น และรู้จักกันดีในการทำขนมปังที่เรียกว่า ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) นอกจากนี้ยังได้นำไปใช้เป็นแหล่งผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์ เพื่อเป็นโปรตีนเสริมสร้างสำหรับคนและสัตว์อีกด้วย

Saccharomyces เซลล์รูปก้อนกลม รูปรีทรงกระบอก หรือยาว สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแยกหน่อนอกเซลล์ อาจสร้างซูโดไมซีเลียม แต่ไม่พบไมซีเลียมจริง สร้างแอสโคสปอร์รูปทรงกลมหรือรูปไข่ ส่วนใหญ่ผนังเรียบมีบางชนิดที่ผนังสปอร์อาจมีปุ่ม โดยปกติมีจำนวน 1- 4 สปอร์ต่อแอสคัส สปอร์หลุดออกจากแอสคัสได้ยาก ทุกชนิดหมักได้เร็ว ไม่ใช้ไนเตรตยีสต์สกุลนี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 *Saccharomyces sensu stricto* กลุ่มนี้มีมากชนิดที่สุด สมาชิกในกลุ่มนี้เป็นพวกดิพลอย์ ที่รู้จักกันดี ได้แก่ *S.cerevisiae* และ *S.uvarum*

กลุ่มที่ 2 เดิมอยู่ในสกุล *Zygosachharomyces* กลุ่มนี้เป็นพวกเฮพลอยด์ สมาชิกในกลุ่มนี้จะประกอบด้วยพวกที่ชอบน้ำตาลหลายชนิด เช่น S.baili *var.osmophilis, S.bisporus var.mellis*

กลุ่มที่ 3 เดิมอยู่ในสกุล *Torulaspora* และ Debaryomyces *globosus* สมาชิกในกลุ่มนี้เป็นพวกเฮพลอยด์ ส่วนผนังแอสโคสปอร์มีปุ่ม

การวิจัยนี้ใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมีลักษณะสำคัญ คือ

- ให้ผลผลิตสูง จากการใช้โมลาสเป็นวัตถุดิบ
- มีอัตราการหมักเอทานอลได้สูงถึง 10 - 12 ดีกรี
- เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีความทนต่อปริมาณเอทานอลและทนต่ออุณหภูมิสูงได้ เหมาะสมที่ 35 - 37 องศาเซลเซียส
- ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่างๆในระหว่างการผลิตทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้เหมาะสมที่พีเอช 4.5 - 5.0
- ทนต่อแรงดันออสโมซิสของอาหารที่ใช้ในการหมักได้สูง
- มีพันธุกรรมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงง่ายแม้จะนำกลับมาใช้ใหม่
- ธาตุอาหารเกลือแร่ที่ต้องการ คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เป็นต้น

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกระบวนการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ [5]

ยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักต้องมีคุณสมบัติที่ส่งเสริมให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วสมบูรณ์และให้ปริมาณเอทานอลสูงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก

2.2.3.1 คุณลักษณะที่พึงประสงค์ของยีสต์

- ยีสต์ที่ใช้สามารถเริ่มต้นกระบวนการหมักได้อย่างรวดเร็ว ควรมีระยะฟักตัวหรือปรับตัว (lag phase) ที่สั้นมากและเข้าสู่ระยะการเจริญ (log phase) ได้อย่างรวดเร็ว การที่ยีสต์สามารถเริ่มกระบวนการหมักได้อย่างรวดเร็วจะเป็นการลดระยะเวลาของกระบวนการหมักให้น้อยลงได้
- ยีสต์ที่ใช้ควรมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลที่มีอยู่ไปเป็นแอลกอฮอล์ ได้ในปริมาณสูง
- ยีสต์ที่ใช้ต้องสามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอล ได้ในปริมาณสูงเนื่องจากการที่กระบวนการหมักดำเนินอยู่ ความเข้มข้นเอทานอลจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งความเข้มข้นเอทานอล ที่สูงขึ้นสามารถที่จะไปยับยั้งการเจริญของยีสต์และทำให้ยีสต์ตายได้ซึ่งอาจทำให้กระบวนการหมักสิ้นสุดลงก่อนที่การหมักจะเกิดได้อย่างสมบูรณ์
- ยีสต์ต้องทนต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้ดีโดยซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีเช่นเดียวกับเอทานอล ซึ่งจะมีการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในกระบวนการหมักเพื่อเป็นการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่มีอยู่ในสารตั้งต้นก่อนทำการหมัก

2.2.3.2 สารองค์ประกอบต่างๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

- ไนโตรเจน โดยทั่วไปยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบถึง 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยีสต์ต้องการไนโตรเจนเพื่อควบคุมการทำงานของวัฏจักร glycolysis ภายในเซลล์ แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโน และแอมโมเนียมซัลเฟต จึงต้องเติมสารอาหารในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของยีสต์และกระบวนการหมักเป็นไปได้อย่างสมบูรณ์ [10]

- แร่ธาตุ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอล ของยีสต์ แร่ธาตุแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก คือ

ก. Macro elements ได้แก่ K , Mg , Ca , Zn , Fe , Mn และ Cl ซึ่งยีสต์ต้องการ ในปริมาณ 0.1 - 100 mM

ข. Micro elements ได้แก่ Co , B , Cd , Cr , Cu , I , Mo , Ni และ Va ต้องการปริมาณ 0.1 - 1 mM

ค. Inhibitor ได้แก่ Ag , As , Hg , Li , Os , Pd , Se และ Te ซึ่งความเข้มข้นของแร่ธาตุนี้สูงกว่า 10 - 100 mM สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิต เอทานอลของยีสต์

- ฟอสฟอรัส จะอยู่ในรูปของเกลือฟอสเฟต มีความจำเป็นในการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ เพราะต้องใช้ในการสังเคราะห์ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและช่วยในการรักษาสภาพผนังเซลล์ของยีสต์

- วิตามิน เป็นสารควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์โดยควบคุม enzyme activity ต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ วิตามินทำหน้าที่เป็นโคเอนไซน์ (coenzyme) หรือสารเริ่มต้นที่ทำให้เอนไซน์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิตามินที่สำคัญ ได้แก่ biotin riboflavin thiamino และกรด panthoenic เป็นต้น ปริมาณความต้องการวิตามินแต่ละชนิดขึ้นกับพันธุ์ของยีสต์

2.2.3.3 ผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อสภาวะของกระบวนการหมัก [11]

- อุณหภูมิมีผลอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ อุณหภูมิของยีสต์โดยปกติในน้ำหมักที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์จะอยู่ในช่วง 30 – 35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ชนิดนั้นด้วย แต่ในการหมักน้ำตาลจนได้แอลกอฮอล์นั้นจะเกิดความร้อน (การหมักน้ำตาลกลูโคส 1 กรัมจะเกิดความร้อนขึ้น 140.2 แคลอรี) ความร้อนที่เกิดขึ้นจากการหมัก จะถูกถ่ายเทลงในน้ำหมักทำให้มีอุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งหากอุณหภูมิในน้ำหมักสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ขึ้นไปยีสต์มักจะทนไม่ได้และจะทำให้การหมักหยุดชะงักลง ดังนั้นในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการหมักจึงควบคุมไม่ให้มีอุณหภูมิสูงเกิน 35 องศาเซลเซียส แต่ถ้าน้ำหมักใน 10 ชั่วโมงแรกมีอุณหภูมิสูงถึง 37 องศาเซลเซียส อาจกระตุ้นให้แบคทีเรียเจริญมากเกินไปเป็นผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ส่วนในช่วงหลังจาก 10 ชั่วโมงขึ้นไป ก็ควรควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้การหมักดำเนินไปด้วยดี นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อคุณภาพของผลผลิตที่จะได้ด้วย การหมักที่อุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เกิดสารอื่นๆขึ้นแทนเอทิลแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะฟูเซลออย์ (fusel oil) ซึ่งส่งผลต่ออาการมึนเมาและปวดหัวของผู้บริโภค ดังตารางที่ 2.2

- ความเป็นกรด - ด่าง นับว่ามีผลต่อการเจริญของยีสต์มาก ยีสต์ชอบเจริญในสภาพที่เป็นกรด คือมีความเป็นกรด - ด่าง อยู่ในช่วง 3.8 - 5.5 ถ้าค่าความเป็นกรด - ด่าง ต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลงและหยุดการชะงักการเจริญที่ ความเป็นกรด - ด่างต่ำกว่า 3.0 ดังนั้นจึงควรทำการปรับสภาพน้ำหมักให้มี ความเป็นกรด - ด่าง อยู่ในช่วง 4.0 - 4.5 ซึ่งเหมาะต่อการทำงานของยีสต์ และยังเป็น

ตารางที่ 2.2 อุณหภูมิของน้ำหมักที่มีผลต่อการทำงานของยีสต์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	สภาวะที่เกิดขึ้นในการหมัก
25 – 30	ยีสต์ทำงานได้ดี
31 – 36	ยีสต์ทำงานหนัก
37 – 41	ยีสต์เริ่มทำงานหยุดชะงักและตายลง เริ่มเกิดแบคทีเรียแทน
สูงกว่า 41	ยีสต์อ่อนแอและตายจำนวนมาก มีแบคทีเรียจำนวนมาก

ผลดีต่อการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มักเจริญในสภาพความเป็นกรด - ด่าง ที่เป็นกลาง แต่ก็มีแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่เจริญได้ดีในระดับความเป็นกรด - ด่าง เดียวกับยีสต์ที่เจริญ และมักจะสร้างปัญหาให้กับยีสต์โดยการสร้างกรดออกมามากเกินไปจนยีสต์ทนไม่ได้ นอกจากนี้การปรับ ความเป็นกรด - ด่าง ให้เหมาะสม จะช่วยลดเวลาการให้ความร้อนในการฆ่าเชื้อในหัวเชื้อหมัก (starter) ลงได้ เพราะความร้อนที่อุณหภูมิเท่ากันจะทำลายแบคทีเรียในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดได้มากกว่าในสภาพที่เป็นกลาง การติดตามค่าความเป็นกรด - ด่าง ในระหว่างการหมักนับว่าเป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้เพราะบ่อยครั้งที่ค่าความเป็นกรด - ด่าง จะช่วยบอกให้ทราบถึงปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักหรือการคะเนผลการหมัก วิธีการ คือ สังเกตควบคู่กันระหว่างอุณหภูมิน้ำหมักที่สูงขึ้นผิดปกติ และความเป็นกรด - ด่าง ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่แอลกอฮอล์ไม่ได้สูงขึ้น ซึ่งแสดงการเจริญของแบคทีเรียอย่างรวดเร็วในน้ำหมักนั้นเอง

- ความเข้มข้นของน้ำตาล การใช้น้ำหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง 25 เปอร์เซ็นต์จะมีผลต่อการทำงานและการเจริญของยีสต์ เนื่องจากความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นภายในและภายนอกเซลล์ (แรงดันออสโมติก) มีค่าน้อยลงทำให้การแพร่ของสารอาหารและน้ำเข้าสู่ภายในเซลล์ทำได้ยากขึ้น การเจริญของยีสต์อาจลดลงหรือหยุดชะงักได้ ทั้งนี้ขึ้นกับความทนทานของยีสต์ในแต่ละสายพันธุ์ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ยังมีผลต่อปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ โดยการหมักในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง แอลกอฮอล์ที่ได้จะไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ ถ้าต้องการหมักแอลกอฮอล์ให้ได้สูงกว่านี้จะต้องหมักที่อุณหภูมิต่ำกว่า และเติมน้ำตาลให้ทีละน้อย การหมักจะดำเนินไปอย่างช้าๆ และใช้ระยะเวลาในการหมักเกินกว่า 1 สัปดาห์หรืออาจถึงเดือน

- ออกซิเจน [12] ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกเฟคัลเททีฟ แต่ยีสต์เจริญเติบโตได้ดี ในสภาพที่มีออกซิเจน ส่วนในสภาพที่ขาดออกซิเจนเจริญเติบโตได้ช้า เพราะยีสต์ใช้น้ำตาลโดยการออกซิเดชันที่สมบูรณ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ในช่วงของการหมักเพื่อให้เกิดเอทานอลนั้น หากมีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำแทนการให้เอทานอล หรือการหมักถูกยับยั้งโดยการหายใจเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “ pasteur effect ” ในสภาพมีออกซิเจนแต่ถ้าหากมีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลให้เอทานอลแทน

การหายใจให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ หรือการหายใจถูกยับยั้งด้วยการหมัก ยีสต์บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้เฉพาะในสภาพที่มีออกซิเจน ไม่มีความสามารถในการหมัก

ยีสต์ส่วนใหญ่เติบโตได้ดีในสภาพที่มีความชื้นเพียงพอแต่มียีสต์หลายชนิดที่สามารถเติบโตในสภาพที่ความเข้มข้นตัวถูกละลาย เช่น เกลือและน้ำตาลสูง ซึ่งได้แก่ ออสโมฟิลิกยีสต์ และยีสต์ทนเกลือ ยีสต์ส่วนใหญ่ต้องการความชื้นในการเติบโตมากกว่าราแต่น้อยกว่าแบคทีเรีย ส่วนใหญ่ค่า a_w ต่ำสุดสำหรับยีสต์ทั่วไปอยู่ระหว่าง 0.88 - 0.94 ส่วนพวกออสโมฟิลิกยีสต์มีค่า a_w ต่ำสุดคือ 0.62 - 0.65 ค่า a_w สำหรับการเติบโตของยีสต์นั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของอาหาร ความเป็นกรด - ด่าง อุณหภูมิ ออกซิเจน ดังตารางที่ 2.3

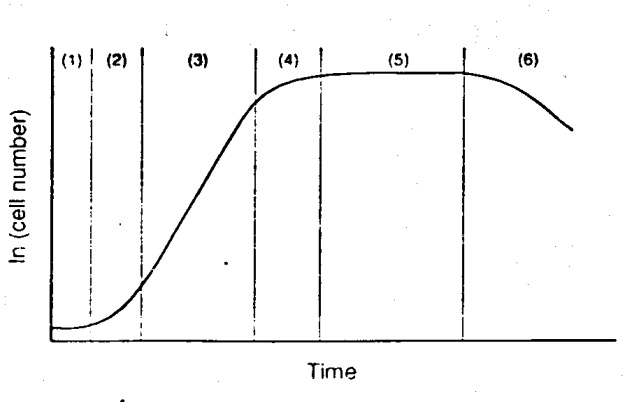
ตารางที่ 2.3 ค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเติบโตของยีสต์บางชนิด [12]

ชนิด	a_w	ตัวถูกละลายในอาหาร
Schizosaccharomyces octosporus	0.98	โซเดียมคลอไรด์
Pichia pastosis	0.98	โซเดียมคลอไรด์
Hansenulu saturnus	0.97	โซเดียมคลอไรด์
Hansenulu canadensis	0.97	โซเดียมคลอไรด์
Saccharomyces microellipsodes	0.95	โซเดียมคลอไรด์
Saccharomyces cerevisiae	0.94	โซเดียมคลอไรด์
Saccharomyces microellipsodes	0.95	โซเดียมคลอไรด์
Saccharomyces cerevisiae	0.94	โซเดียมคลอไรด์
Saccharomyces rouxii	0.86	โซเดียมคลอไรด์
Debaryomyces hansenii	0.83	โซเดียมคลอไรด์
Saccharomyces cerevisiae	0.92	กลูโคส
Saccharomyces rouxii	0.84	กลูโคส
Saccharomyces cerevisiae	0.80	ซูโครสและกลีเซอรอล
Hansenulu anomala	0.75	ซูโครสและกลีเซอรอล
Saccharomyces bisporus var. Mellis	0.70	ซูโครสและกลีเซอรอล
Torulopsis candida (3 สายพันธุ์)	0.65-0.75	ซูโครสและกลีเซอรอล
Saccharomyces rouxii	0.65	ซูโครสและกลีเซอรอล
Saccharomyces rouxii	0.61	ฟรักโทส

2.3 การเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) [8]

การเพาะเลี้ยงแบบกะ หมายถึง การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเชื้อที่กำหนดปริมาตรเอาไว้แน่นอนในระยะเวลาที่เหมาะสม จุลินทรีย์ จะเติบโตภายใต้สภาวะที่กำหนดดังกล่าวซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่เกิดจากการสะสมของของเสียที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายของจุลินทรีย์

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์วิธีนี้ถือเป็นระบบปิด คือมีการกำหนดปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเพาะเชื้อเอาไว้ โดยที่อัตราการเติบโตจะลดลงเรื่อยๆ และมีแนวโน้มเป็นศูนย์เนื่องจากการสะสมของของเสียและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น จึงถือว่าการเพาะเลี้ยงแบบนี้ระบบจะมีลักษณะไม่คงที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (transient states) และโดยทั่วไปสามารถแบ่งช่วงการเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบนี้ได้เป็น 6 ระยะ คือ 1. ปรับตัว 2. การเติบโตเร่ง 3. การเติบโตเอกซ์โพเนนเชียล 4. การเติบโตลด 5. การเติบโตคงที่ และ 6. การเติบโตเสื่อม ดังแสดงในรูปที่ 2.1 พบว่าจุลินทรีย์มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นหลังจากผ่านระยะปรับตัวไปแล้ว และเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม อัตราการเติบโตสูงสุดที่ได้ในระยะการเติบโตเอกซ์โพเนนเชียลจะเริ่มลดลง โดยที่ปริมาณของจุลินทรีย์จะมากที่สุดเมื่อถึงระยะการเติบโตคงที่ และจะลดลงในระยะการเติบโตเสื่อม เนื่องจากมีการย่อยตัวเอง (autolysis) เกิดขึ้น



รูปที่ 2.1 การแบ่งระยะการเติบโตของจุลินทรีย์ [12]

พารามิเตอร์การเติบโตของจุลินทรีย์การเติบโตของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปัจจัย คือ กล้าเชื้อที่มีชีวิตอยู่ (Viable inoculum) แหล่งพลังงาน (Energy source) สารอาหาร (Nutrients) สารยับยั้งการเติบโต (Inhibitors) และภาวะทางเคมีกายภาพ (Physicochemical conditions) เมื่อปัจจัยดังกล่าวอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมโดยปราศจากสารยับยั้งการเติบโต พบว่าอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์เป็นไปตามสมการต่อไปนี้

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu C_X \qquad (2.1)$$

โดยที่ C_X = ปริมาณของเซลล์ (g/l)

t = เวลา (h)

μ = อัตราจำเพาะของการเติบโต (h^{-1})

ในระยะการเติบโตเอกซ์โพเนนเชียล อัตราจำเพาะของการเติบโต (μ) มีค่าคงที่ คือ การเติบโตของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ และเมื่ออินทิเกรตสมการ (2.1) จะได้

$$\ln C_X = \ln C_{X\,0} + \mu\, t \qquad (2.2)$$

หรือ

$$\log C_X = \frac{\mu t}{2.303} + \log C_{XO} \qquad (2.3)$$

ดังนั้น

$$\ln \frac{C_X}{C_{XO}} = \mu\, t \qquad (2.4)$$

$$C_X = C_{XO}\, e^{\mu t} \qquad (2.5)$$

พารามิเตอร์ที่สำคัญ ๆ ในกระบวนการหมัก

เวลาทวีคูณ (t_d) หมายถึง เวลาที่ใช้ไปเพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์เป็น 2 เท่า ($C_X = 2C_{X_0}$) จากสมการ (2.5) จะได้ว่า

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \qquad (2.6)$$

ระดับขั้นของการเพิ่มจำนวน (C_X/C_{XO}) ซึ่งมีค่าเท่ากับ $e^{\mu t}$ ในสมการ (2.5) และถ้าหากว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นมีค่าเป็น n ชั่วรุ่น จะได้ว่า

$$\frac{C_X}{C_{XO}} = 2^n \qquad (2.7)$$

$$n = 3.32 \log \frac{C_X}{C_{XO}} \qquad (2.8)$$

ส่วนกลับเวลาทวีคูณ ($1/t_d$) เมื่อแทนค่า $\mu = \ln 2/t_d$ จากสมการ (2.6) ในสมการ (2.5) จะได้

$$C_X = C_{XO}\, 2^{\frac{t}{t_d}} \qquad (2.9)$$

หรือ

$$\log C_X = \log 2C_{XO} + \frac{t}{t_d} \qquad (2.10)$$

ผลได้ หาได้โดยการกำหนดให้

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \qquad (2.11)$$

โดยที่ C_{XO} , C_{SO} = ปริมาณเซลล์และความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น

C_X , C_S = ปริมาณเซลล์และความเข้มข้นของสารอาหารในระหว่างการเติบโต

จะได้ว่า

$$C_X - C_{XO} = Y_{X/S} \ (C_{SO} - C_S) \qquad (2.12)$$

ถ้าสับสเทรตนั้นเป็นสารอาหารจำกัดการเติบโต และ $C_X \approx C_{X_{max}}$ เมื่อ $C_S \approx 0$ จะได้ว่า

$$C_{X_{max}} - C_{XO} = Y_{X/S} C_{SO} \qquad (2.13)$$

ถ้าเขียนกราฟระหว่าง $C_{X_{max}}$ และ C_{SO} จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ $YX_{/S}$

อัตราจำเพาะ (q) จากความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในการใช้สารอาหารชั่วขณะหนึ่งสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\frac{dC_S}{dt} = q_S C_X \qquad (2.14)$$

โดยที่ q_S = อัตราจำเพาะของการใช้สารอาหาร (g/l· h)

ค่า q_S คงที่เมื่อคุณลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของสารอาหารเนื่องจากถูกจุลินทรีย์ใช้ไปมีความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้

$$dC_S = \frac{\mu C_X}{Y_{X/S}} dt \qquad (2.15)$$

เพราะฉะนั้นจะได้ว่า

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \qquad (2.16)$$

สมการ (2.16) นี้มักใช้ในการหาปริมาณของสารอาหารที่ต้องการ เมื่อค่า μ เปลี่ยนไป สำหรับอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ เนื่องจากจุลินทรีย์นั้นมีความสัมพันธ์ดังนี้

$$\frac{dC_P}{dt} = q_P C_X \qquad (2.17)$$

โดยที่ q_p = อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์

ในระยะการเติบโตเอกซ์โพเนนเชียลของการเพาะเลี้ยงแบบชุดนั้น พบว่าอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์ไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารอาหาร และมีจลนพลศาสตร์อันดับศูนย์ ซึ่งสามารถนำเอาทฤษฎีของจลนพลศาสตร์เอนไซม์มาใช้อธิบายได้ดังนี้

$$q_S = \frac{q_S^{max} C_S}{K_S + C_S} \qquad (2.18)$$

โดยที่ K_S = ค่าคงที่อิ่มตัว (ซึ่งเท่ากับค่าคงที่ Michaelis-Menten)

q_S^{max} = ค่าสูงสุดของ q_S เมื่อ $C_S >> K_S$

เมื่อแทนค่า $q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}}$ และ $q_S^{max} = \frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}}$ ลงในสมการ (2.18) จะได้ว่า

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{K_S + C_s} \qquad (2.19)$$

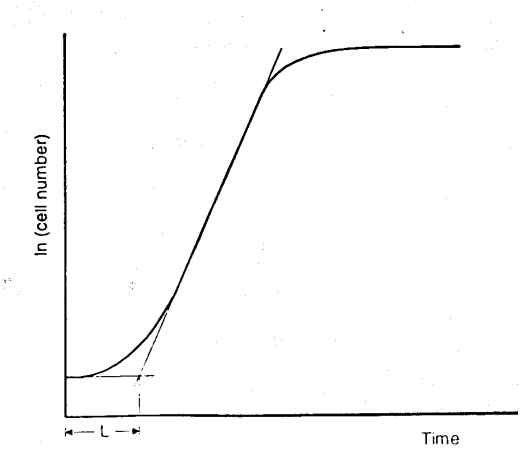
สมการ (2.19) นี้เรียกว่า “Monod equation” โดยอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของสารอาหารเดี่ยว และเมื่อจัดรูปสมการ (2.19) จะได้

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{max}} \frac{1}{C_S} + \frac{1}{\mu_{max}} \qquad (2.20)$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\frac{1}{\mu}$ กับ $\frac{1}{C_S}$ จะได้รูปเส้นตรงที่มีจุดตัดแกนเอ็กซ์เท่ากับ $\frac{-1}{K_S}$ และจุดตัดแกนวายเท่ากับ $\frac{1}{\mu_{max}}$ เรียกวิธีการนี้ว่า Lineweaver - Burk plot

ระยะปรับตัว (L) ถ้าเขียนรูปกราฟระหว่างค่าล็อกของปริมาณเซลล์กับเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เรียกว่า “growth curve” เมื่อต่อเส้นตรงจากระยะของการเติบโตเอกซ์โพเนนเชียลตัดกับเส้นตรงที่ลากจุดของปริมาณเซลล์เริ่มต้น (จากแกน Y) จะได้เวลาบนแกน X ที่เรียกว่า ระยะปรับตัวก่อนการเติบโต (L) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 และจากสมการ (2.20) จะได้ว่า

$$\ln C_X = \mu (t-L) + \ln C_{X_0} \qquad (2.21)$$



รูปที่ 2.2 การหาระยะปรับตัวก่อนการเติบโต [8]