บทที่ 12
โภชนาการที่จำเป็นต่อการหมัก

12.1 คำนำ

โภชนาการหรือสารอาหารที่ต้องการเพื่อการเจริญเติบโตนอกจากพวกที่เป็นแหล่งพลังงานแล้วยังมีพวกที่อาจถูกจัดแบ่งออกได้เป็นหมวดหมู่ดังต่อไปนี้ คือ (1) พวกที่เป็นแหล่งของธาตุหลัก(**major element**) คือ **C, H, O** และ **N** (2) พวกที่เป็นแหล่งของธาตุรอง(**minor element**) คือ **P, K, S, Mg** (3) วิตามินและฮอร์โมน (4) พวกที่เป็นแหล่งของธาตุปลีกย่อย (**trace element**) คำว่าปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโต (**growth factor**) หมายถึงอินทรีย์สารโภชนาการที่จำเป็นต่าง ๆ เช่นกรดอะมิโนที่อาจถูกนำเอาเข้าไปร่วมอยู่ในโครงสร้างของเซลล์ได้ทั้งแท่งโดยไม่ต้องผ่านการดัดแปลงเสียก่อน คำจำกัดความเช่นนี้ไม่ได้หมายรวมถึงแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนที่ต้องถูกทำให้สลายตัวไป (**catabolize**) แหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนดังกล่าวมาแล้วในบทที่ 8 มักทำหน้าที่เป็นแหล่งออกซิเจนและไฮโดรเจนของเซลล์ได้ด้วย ในบทนี้จะได้กล่าวถึงแหล่งไนโตรเจนและโภชนาการหมู่อื่น

จุลินทรีย์และเซลล์เนื้อเยื่อถูกเพาะเลี้ยงได้เป็นครั้งแรกในสื่อกลางอาหารธรรมชาติที่ได้มาจากสิ่งสกัดต่าง ๆ จากพืชหรือสัตว์ ตัวอย่างเช่น น้ำผลไม้ น้ำนม น้ำแช่-เมล็ดข้าวโพด เพ็พโตน และน้ำเหลืองหรือเลือดเหล่านี้เป็นต้น สื่อกลางอาหารเหล่านี้มีความสดวกต่อการใช้เนื่องจากเป็นแหล่งของโภชนาการได้ทั้งสิ่หมู่ แต่มีข้อเสียคือไม่อาจกำหนดให้มีส่วนประกอบที่แน่นอนได้และส่วนประกอบก็มักมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ เพื่อแสดงให้เห็นถึงผลกระทบจากโภชนาการหรือสารอาหารให้มากที่สุดเท่าที่จะมากได้จึงต้องใช้สื่อกลางอาหารสังเคราะห์หรือสื่อกลางอาหารที่มีส่วนประกอบทางเคมีจำกัด สื่อกลางอาหารที่มีส่วนประกอบทางเคมีค่อนข้างกำหนดชัดเจนแน่นอนได้ถูกเสนอขึ้นเป็นครั้งแรกโดย **Pasteur** (1869) ประกอบด้วย กลูโคส แอมโมเนี่ยมตาร์เตรต และขี้เถ้าของยีสต์ สำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์บทบาทของตาร์เตรตนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่อาจเป็น

ตัวการสำคัญทำให้สื่อกลางอาหารเกิดการคัดเลือกเพื่อให้แต่ยีสต์เท่านั้นเจริญเติบโตได้เนื่องจากในสมัยนั้นยังไม่มีกลวิธีการทำให้ได้เชื้อยีสต์ที่บริสุทธิ์ได้ ความจำเป็นสำหรับวิตามินในโภชนาการของจุลินทรีย์ได้ถูกเสนอขึ้นเป็นครั้งแรกเพื่อการเพาะเลี้ยงยีสต์โดย **Wildiers** (1901) และได้แสดงให้เห็นว่าสื่อกลางอาหารที่ถูกกำหนดให้มีส่วนประกอบแน่นอนชัดเจน (**defined medium**) ของ **Pasteur** ไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์จนกว่าจะมีสารอินทรีย์ที่สกัดได้จากยีสต์เซลล์ซึ่งเรียกว่า **bios** เติมลงไปในสื่อกลางอาหารนั้นด้วย ต่อมาจึงพบว่าปัจจัยที่เรียกว่า **bios** ก็คือวิตามินต่าง ๆ ที่ละลายน้ำได้ ปัญหาที่ว่า **Pasteur** ประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในสื่อกลางอาหารที่ถูกกำหนดให้มีส่วนประกอบแน่นอนของเขาได้อย่างไรโดยไม่ต้องเติมปัจจัย **bios** อย่างหนึ่งอาจกล่าวอ้างได้ว่าเป็นผลเนื่องมาจากการใช้แหล่งเชื้อจุลินทรีย์ (**inoculum**) จำนวนมากจึงมีปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตติดมามากจนเพียงพอแก่ความต้องการของยีสต์หรือเนื่องจากการใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมหลายสายพันธุ์และในระหว่างสายพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านั้นสามารถสังเคราะห์ปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตต่าง ๆ ได้เอง

สื่อกลางอาหารที่กำหนดส่วนประกอบต่าง ๆ ชัดเจนที่สมบูรณ์แบบเพื่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ถูกปรับปรุงขึ้นเป็นครั้งแรกสำหรับเชื้อ ***Aspergillus niger*** โดย **Raulin** (1869) ซึ่งเป็นลูกศิษย์คนหนึ่งของ **Pasteur** สื่อกลางอาหารของ **Raulin** ได้จัดเตรียมให้มีธาตุหลัก, ธาตุรอง และสามธาตุย่อย (**Fe , Zn and Si**) ทั้งหมดนี้อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์รวมกับน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งของ **C, H, O** และพลังงาน งานการทดลองต่อ ๆ มาก็ได้ยืนยันการค้นคว้าของ **Raulin** เว้นแต่ความต้องการ **Si** ในรูปของซิลิเกต **Raulin** ได้กำหนดไม่เพียงแต่ความต้องการในด้านคุณภาพเท่านั้นยังกำหนดความต้องการในเชิงปริมาณสำหรับสารอาหารหรือโภชนาการแต่ละชนิดในรูปแบบของพืชผลหรือประสิทธิภาพการเจริญเติบโตอีกด้วย แต่เป็นที่น่าเสียดายว่างานการทดลองส่วนใหญ่ต่อมาได้ละทิ้งการตรวจสอบพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากสารอาหารที่จำเป็นต่อการกำหนดกำจัดปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ที่ต้องการ

สื่อกลางอาหารขั้นต่ำ(**minimal medium**) เป็นสื่อกลางอาหารอย่างหนึ่ง ซึ่งมีสารอาหารหรือโภชนาการเพียงเท่าที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตเท่านั้น สื่อกลางอาหารสมบูรณ์(**rich medium**) เป็นอีกอย่างหนึ่งซึ่งสารอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นถูกเติมลงไปพร้อมด้วยสารอาหารอื่นเพื่อทำหน้าที่เป็นแหล่งซึ่งเลือกได้สำหรับชาตุต่าง ๆ ปกติอยู่ในรูปของ กรดอะมิโน วิตามิน สารสื่อกลางของกรดนิวคลีอิก และสารระหว่างกลางอื่น ๆ เพื่อการสังเคราะห์เซลล์ การทำให้สื่อกลางอาหารมีความอุดมสมบูรณ์อาจเพิ่มอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของชีวมวลและเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่เป็นส่วนประกอบของชีวมวล

ความต้องการทางโภชนาการของจุลินทรีย์อาจเปลี่ยนแปลงได้ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพตามสภาวะของเชื้อจุลินทรีย์ อุณหภูมิอาจมีผลต่อความต้องการปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโต(ดังตอนที่ 13.4) และยังอาจตีความหมายได้ว่าความต้องการทางโภชนาการก็ขึ้นอยู่กับค่าพีเอชและความเข้มข้นของสื่อกลางอาหารด้วย

การเจริญเติบโตที่เริ่มต้นจากแหล่งเชื้อจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อยบางครั้งก็ต้องการสื่อกลางอาหารที่สมบูรณ์กว่าเมื่อเริ่มต้นจากประชากรเซลล์จำนวนมาก ตัวอย่างเช่น *Klebsiella aerogenes* ไม่อาจเจริญเติบโตในสื่อกลางอาหารขั้นต่ำของกลูโคสกับแอมโมเนียได้เมื่อมีขนาดของแหล่งเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่า 10^5 เซล/มล. อย่างไรก็ตามเมื่อเติมกรดอะมิโนแอสปาราจีนหรืออะลานีนจะทำให้ปริมาณความต้องการแหล่งเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นน้อยลงได้ (**Lodge & Hinshelwood, 1943**)

12.2 การวิเคราะห์ปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตด้วยเชื้อจุลินทรีย์

การวิเคราะห์กรดอะมิโน วิตามิน และสารอื่นซึ่งทำหน้าที่เป็นปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตด้วยเชื้อจุลินทรีย์ (**microbiological assay**) ขึ้นอยู่กับความคงที่ของพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิต(**product yield**) ดังได้กำหนดไว้แล้วในบทที่ 2 วัตถุที่ต้องการวิเคราะห์ถูกใช้เป็นซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตโดยมีซับสเตรตอื่นทั้งหมดที่ต้องการอยู่ในปริมาณซึ่งมากเกินพอ โดยแบบฉบับแล้วความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณชีวมวลที่เกิดขึ้นกับปริมาณซับสเตรตที่วิเคราะห์ควร

เป็นเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 12.1 ถ้าให้ x_1 = ชีวมวลใน v ม.ล. ของสารละลายมาตรฐานสำหรับปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตซึ่งมีความเข้มข้น c_1 x_2 = ชีวมวลใน v ม.ล. ของตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ซึ่งมีความเข้มข้น c_2 Y = ผลผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากวัตถุที่วิเคราะห์ จะได้ว่า

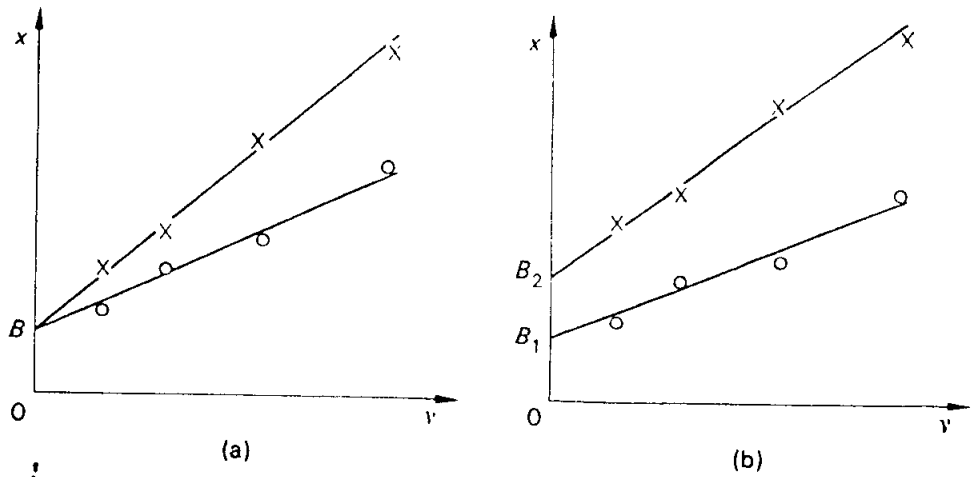
$$x_1 = x_B + Yc_1v \qquad 12.1$$

$$x_2 = x_B + Yc_2v \qquad 12.2$$

ซึ่ง x_B คือค่าตั้งต้น **(blank value)** ประกอบด้วยแหล่งเชื้อจุลินทรีย์หรือชีวมวลเริ่มต้น (x_0) รวมทั้ง**วัตถุที่ต้อง**การวิเคราะห์ (s_B) ซึ่งปรากฏเป็นสิ่งเจือปนอยู่ในสื่อกลางอาหารที่ใช้วิเคราะห์ ดังนั้น

$$x_B = x_0 + Ys_B \qquad 12.3$$

สัดส่วนความลาดเอียงของเส้นกราฟสำหรับสมการที่ 12.1 และ 12.2 จะเป็น c_1/c_2 ดังนั้นค่า c_2 จึงอาจถูกคำนวนได้



รูปที่ 12.1 Microbiological assay of a growth factor by measurement of maximum biomass produced (x); v = volume of sample. (a) Valid assay; (b) non-valid assay. Circles, standard samples; crosses, test samples; B, B_1, B_2 are intercepts.

เพื่อการวิเคราะห์ที่ถูกต้องพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจะต้องเหมือนกันทั้งในสารละลายมาตรฐานและในสารละลายเพื่อการทดสอง เมื่อเป็นเช่นนั้นค่าการเจริญเติบโตดั้งเดิม (**blank growth**, Ys_B) ในสมการที่ 12.3 จึงเหมือนกันทั้งในสารละลายเพื่อการทดสอบและในสารละลายมาตรฐาน ดังนั้นจุดตัดบนแกนตั้งจึงเท่ากัน ดังแสดงในรูปที่ 12.1 (a) แต่ถ้าพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีค่าไม่เท่ากันทั้งนี้อาจเนื่องจากมีสารเจือปนทำหน้าที่เป็นสารสำรองของปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตปะปนอยู่ด้วยจะทำให้การวิเคราะห์ไม่ถูกต้องสมบูรณ์และความไม่ถูกต้องสมบูรณ์ของการวิเคราะห์ก็อาจถูกแสดงออกได้ด้วยความไม่เท่ากันของจุดตัดบนแกนตั้งดังแสดงในรูปที่ 12.1 b ในกรณีนี้จุดตัดคือ $x_{B1}=x_0+Y_1s_B$ และ $x_{B2}=x_0+Y_2s_B$ ซึ่ง Y_1 และ Y_2 คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และการทำให้มีค่า $s_B>0$ มีความจำเป็นต่อการทดสอบความถูกต้องสมบูรณ์ในกรณี

12.3 ความต้องการไนโตรเจน

12.3.1 คำนำ

แหล่งธาตุไนโตรเจนซึ่งสามารถใช้ได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิดแตกต่างกันอาจหมายรวมถึงส่วนใหญ่แม้จะไม่ทั้งหมดของธาตุไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ไนโตรเจนส่วนใหญ่ถูกเมตาโบไลซ์เพื่อทำให้เป็นโปรตีน กรดนิวคลีอิกและโพลีเมอร์ของผนังเซลล์ กรดอะมิโนกองกลาง(**amino acid pool**) ในไซโตพลาสซึมทั้งหมดมีเป็นจำนวนประมาณ 0.25 ถึง 5% ของชีวมวลแห้ง(**Mandelstam**, 1958 ; **Brown & Stanley**, 1972) กรดอะมิโนกองกลางส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลูตาเมตไนโตรเจนภายในเซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่มีเป็นจำนวนประมาณ 12% ของน้ำหนักแห้งและ 10% ของน้ำหนักแห้งสำหรับพังไข

12.3.2 ความต้องการไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโน

มีบ่อยครั้งที่เดียวที่กรดอะมิโนเป็นปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโต สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนและเพื่อจุดประสงค์อื่นอีกหลายอย่างเซลล์มักต้องการ**L-amino acid**

อย่างไรก็ตามบางครั้งก็ต้องการ **D-amino acid** ประกอบด้วย ตัวอย่างเช่น **D-alanine** และ**D-aspartic acid** กรดอะมิโนสองตัวนี้มักรวมเข้าไปอยู่ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย กรดอะมิโนอาจถูกทำให้เปลี่ยนแปลงรูปแบบไป (**racemize**)ในชีวมวลเพื่อให้กลายเป็นไอโซเมอร์(**isomer**) ที่ต้องการ โปรตีนในเซลล์มักมีกรดอะมิโนแต่ละอย่างจำนวนประมาณ 1 ถึง 5% โดยพื้นฐานนี้ปริมาณของกรดอะมิโนที่ต้องการเพื่อเป็นปัจจัยในการเจริญเติบโตอาจถูกตรวจสอบได้อย่างคร่าว ๆ เว้นแต่กรดกลูตามิกหรือกลูตามีนซึ่งแสดงบทบาทอย่างสำคัญในการเมตาโบลิซึ่มของกรดอะมิโนจึงจำเป็นต้องทำให้มีอยู่เป็นจำนวนมากหลายเท่าของกรดอะมิโนอื่น (**Davies et al., 1965 : Griffiths & Pirt, 1967**)

12.3.3 ความต้องการไนโตรเจนในรูปของเพ็บไทด์

แบคทีเรียที่ต้องการกรดอะมิโนบางชนิดอาจเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเมื่อจัดเตรียมให้มีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดของกรดอะมิโนในรูปแบบของเพ็บไทด์ ตัวอย่างเช่น ฮิสติดีนเพ็บไทด์สำหรับ **Lactobacillus delbrueckii** (**Peters et al., 1953**) **Lactobacillus casei** เมื่อเจริญเติบโตในสภาพที่ปราศจากไพริดอกซินจะต้องการทั้ง ดี – และ แอล – อะลานีน อย่างไรก็ตาม ดี – อะลานีนขัดขวางการใช้ แอล – อะลานีน แต่การขัดขวางนี้อาจถูกระงับได้โดยให้แอล – อะลานีนในรูปแบบของเพ็บไทด์ (**Kihara & Snell, 1952**) เช่นเดียวกันกับการใช้ซีรีนของ **L. delbrueckii** ถูกขัดขวางได้โดยทั้งดี – และแอล – อะลานีน แต่การขัดขวางนี้อาจถูกระงับได้โดยใช้ซีรีนเพ็บไทด์ (**Prescott et al., 1953**) ใน **Streptococcus faecalis** ไทโรซีนจำนวนมากถูกดีคาร์บอก–ซีเลตจนกระทั่งอาจขาดแคลนไทโรซีนได้แต่ไทโรซีนไดเพ็บไทด์สามารถให้ไทโรซีนแก่แบคทีเรียเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (**Kihara et al., 1952**)

มีบ่อยครั้งที่เดียวที่กรดอะมิโนก็กระทำตัวเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโต การยับยั้งโดยกรดอะมิโนถูกจัดเป็นแบบแข่งขันถ้าการยับยั้งนั้นถูกขัดขวางได้ด้วยกรดอะมิโนอื่นหรือเป็นแบบไม่แข่งขันถ้าไม่สามารถระงับได้ด้วยกรดอะมิโนอื่น การขัดขวางกันอาจสังเกตุเห็นได้จากการใช้กรดอะมิโนในหมู่ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (1) เฟนนิลอะลานีน, ไทโรซีน และทริพโตเฟน (2) ซีรีน ทรีโอนีน อะลานีน และไกลซีน (3) กรดกลูตามิก

และกรดแอสปาร์ติก (Snell, 1949 ; Lichstein, 1960) (4) วาลีน ลิวซีน และไอโซลิวซีน (Kepes & Cohen, 1962, p. 210) (5) นอร์ลิวซีน และเมไทโอนีน (Kepes & Cohen 1962, p; 211) การขัดขวางกันนี้เชื่อว่าเกิดขึ้นเนื่องจากการยื้อแย่งแข่งขันกันใช้เอนไซม์เพอร์มีเอสอย่างเดียวกัน ในเตรตไออ้อนขัดขวางการใช้เมไทโอนีนโดยสายพันธุ์ที่เป็นออกโซโทรฟ (auxotrophic strain) ของ Cephalosporium แต่แอมโมเนียไออ้อนก็ระงับการขัดขวางนี้ได้ ฮิสติดีนยับยั้งการเจริญเติบโตของ Bacillus subtilis ที่ผ่าเหล่าแต่ถูกระงับได้ด้วยไกลซีนไตรเพ็บไทด์ (Demain & Hendlin, 1958) แบคทีเรียชนิดเดียวกันนี้ยังอาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้โดยเคซีนที่ถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้นสูงเกินกว่าประมาณ 100 ไมโครกรัม/ม.ล. การยับยั้งการเจริญเติบโตแบบไม่แข่งขันโดยกรดอะมิโนและสารระหว่างกลางต่าง ๆ ของกรดอะมิโนในขบวนการเมตาโบลิซึ่มมักมีการค้นพบอยู่เสมอในจุลินทรีย์พวกออโตโทรฟ (Kelly, 1967, p. 47) และในแบคทีเรียที่เจริญเติบโตด้วยสารประกอบ C_1 ต่าง ๆ เช่น มีเทนเหล่านี้เป็นต้น (Eroshin et al., 1968)

12.3.4 การเจริญเติบโตที่ถูกกำหนดจำกัดโดยไนโตรเจน

ปริมาณโปรตีนของชีวมวลที่การเจริญเติบโตถูกจำกัดด้วยไนโตรเจนจะต่ำกว่าที่การเจริญเติบโตถูกจำกัดด้วยคาร์บอนตัวอย่าง เช่นยีสต์เมื่อจำกัดแอมโมเนียมีโปรตีนประมาณ 30% แต่เมื่อจำกัดกรีเซอรอลมีโปรตีนประมาณ 50% อย่างนี้เป็นต้น (Light, 1972) ในสภาพที่มีโปรตีนปริมาณต่ำแต่มีแหล่งคาร์บอนจำนวนมากเกินพออาจมีผลทำให้เกิดการสะสมแหล่งพลังงาน เช่น ไกลโคเจนในชีวมวลขึ้นได้

12.4 ความต้องการวิตามินและฮอร์โมน

คำว่าวิตามินที่ใช้ในที่นี้หมายถึงปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตที่นอกเหนือจากกรดอะมิโนต่าง ๆ วิตามินอาจถูกจัดแบ่งออกได้เป็นสองพวกคือ พวกที่ละลายในไขมันและพวกที่ละลายน้ำ พวกที่ละลายในไขมันประกอบด้วยวิตามิน เอ, ดี, อี, เค, ยูบิควิโนน, คอเลสทีรอล และกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (oleic , linoleic , linolenic and

arachidonic acids) วิตามิน เอ, ดี และอีมีความสำคัญต่อโภชนาการของมนุษย์และสัตว์แต่ยังไม่พบว่ามีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของโปรติสท์ใด ๆ กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวมีความจำเป็นต่อแลคโตบาซิลไลบางชนิด (**Snell, 1949**) และสายพันธุ์หนึ่งของ **Sarcina** (**Lichstein, 1960**) กรดไขมันอาจถูกใช้ได้โดยสดวกในรูปของสารประกอบเอสเทอร์ที่ละลายน้ำได้เช่น สารประกอบพวก **Tween** ต่าง ๆ คอเลสทีรอลเป็นที่ต้องการของจุลินทรีย์พวกไมโคพลาสม่าหลายชนิด

วิตามินที่ละลายน้ำได้คือ กรดแอสคอร์บิค ไทอะมีน ไรโบฟลาวิน กรดแพนโตเทอนิค กรดโฟลิก โบบาลามิน กรดเมวาโลนิค โคลีน และมีโซ–อีโนสิทอล นอกจากนี้ยังมีวัตถุที่เปลี่ยนแปลงมาจากวิตามินหรือที่เรียกว่าไวตาเมอร์ (**vitamer**) ของวิตามินบางชนิด เช่น ไพริดอซามีน และไพริดอซอลเป็นไวตาเมอร์ของไพริดอซิน อย่างนี้เป็นต้น จุลินทรีย์บางชนิดก็มีความต้องการวิตามินในรูปของไวตาเมอร์หนึ่งโดยเฉพาะ วิตามินที่ละลายน้ำได้ทุกชนิดยกเว้นกรดแอสคอร์บิคถูกพบว่าเป็นปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตของโปรติสต์บางชนิดและเซลล์เนื้อเยื่อของสัตว์ที่เพาะเลี้ยงไว้นอกร่างกาย วิตามินที่ละลายน้ำได้ส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบสำคัญของโคเอนไซม์ โคลีนและอีโนสิทอลเป็นองค์ประกอบของลิปิด ในบรรดาไอโซเมอร์ของอีโนสิทอลมีเพียงแต่มีโซ– หรือมายโอ–อีโนสิทอลเท่านั้นที่มีกิจกรรมเป็นปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโต การเติมผลผลิตสุดท้ายของเส้นทางการเมตาโบลิซึ่มที่มีวิตามินเป็นสื่อกลางให้แก่เซลล์อาจทดแทนการใช้วิตามินหรือสารองวิตามินไว้ได้ ตัวอย่างเช่นการใช้กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวทดแทนการใช้ไบโอติน (**koser, 1968**) ในสื่อกลางอาหารที่ไม่กำหนดส่วนประกอบแน่นอนมักใช้สิ่งสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งของวิตามินต่าง ๆ

ความต้องการวิตามินสำหรับเชื้อจุลินทรีย์มักไม่ค่อยมีการกำหนดปริมาณให้แน่นอนในรูปของพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจึงยังไม่ทราบปริมาณที่ต้องการเพื่อทำให้ได้ชีวมวลในปริมาณที่กำหนดได้ ตัวเลขของพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากวิตามินบางอย่างเมื่อให้แก่เชื้อจุลินทรีย์ด้วยปริมาณซึ่งมากเกินพอได้แสดงไว้ในตารางที่ 12.1 พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากวิตามินเมื่อถูกใช้เป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตมักมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้หรือให้จนมากเกินพอ พืชผลหรือ

ประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตอาจเปลี่ยนแปลงกลับกันกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต ตัวอย่าง เช่นพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของยีสต์จากไทอะมีนอาจลดลงจาก 29.0×10^5 เป็น 1.2×10^5 กรัมชีวมวลแห้ง/กรัมไทอะมีนเมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะถูกทำให้เพิ่มขึ้นจาก 0.3 เป็น 0.8 เท่าของค่าสูงสุด (**Button,** 1969) ความต้องการไบโอตินของ **Corynebacterium glutamicus** ลดลงถึง 90% เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตบนอะซีเตตแทนน้ำตาลกลูโคส (**Kinoshita, 1972, p. 27**) ดังนั้นธรรมชาติของแหล่งคาร์บอนและพลังงานจึงมีผลกระทบต่อพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากวิตามินด้วย

ตารางที่ 12.1 Growth yields from vitamins

Vitamin	Protist or cell type	Growth yield* (g dry biomass/g vitamin)
Biotin	Streptococcus[1]	$1{\cdot}08 \times 10^6$
	Mouse LS cell[2]	$2{\cdot}0 \times 10^5$
Folic acid	Mouse LS cell[2]	$2{\cdot}4 \times 10^5$
Riboflavin	Streptococcus[1]	$7{\cdot}4 \times 10^4$
	Mouse LS cell[2]	$2{\cdot}0 \times 10^4$
Pantothenic acid	Streptococcus[1]	$1{\cdot}53 \times 10^4$
	Mouse LS cell[2]	$6{\cdot}0 \times 10^3$
Thiamine	Streptococcus[1]	$1{\cdot}16 \times 10^4$
	Mouse LS cell[2]	$3{\cdot}2 \times 10^4$
Nicotinic acid	Streptococcus[1]	$3{\cdot}4 \times 10^3$
Nicotinamide	Mouse LS cell[2]	$4{\cdot}8 \times 10^2$
Pyridoxin	Mouse LS cell[2]	$4{\cdot}36 \times 10^2$
Mesoinositol	Mouse LS cell[2]	$1{\cdot}56 \times 10^2$
Choline	Mouse LS cell[2]	$0{\cdot}71 \times 10^2$

[1]Carlson (1971), [2]Blaker & Pirt (1971), Blaker (1971)

* Growth yields in presence of excess vitamin

ผลกระทบจากการทำให้วิตามินเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตยังไม่ได้มีการศึกษากันอย่างเป็นระเบียบแต่ก็มีหลักฐานแสดงออกมาอย่างน่าสนใจมาก ตัวอย่าง เช่น การขาดแคลนไบโอตินเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งทำให้เกิดการผลิตกรดกลูตามิคมากเกินความต้องการของ **Corynebacterium glutamicus** การขาดแคลนปรากฏว่าเป็นสาเหตุทำให้เพิ่มการแพร่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยกรดกลูตามิคและทำให้กรดอะมิโนนี้ไม่สามารถถูกเก็บรักษาไว้

ได้ภายในเซลล์ (Kinoshita, 1972, p. 314) สำหรับ LS cell ของหนูที่เพาะเลี้ยงไว้ให้เจริญเติบโตนอกร่างกายโดยจากัดโคลีนหรืออีโนสิทอลมีผลทำให้เซลล์เกิดการงอกโครงสร้างที่คล้ายตาหรือหน่อเกิดขึ้นจึงแสดงว่าเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย (Pirt, 1975, p. 122)

นอกจากนี้ยังมีการขัดแย้งกันในระหว่างวิตามินต่าง ๆ ตัวอย่างเช่นระหว่างไทอะมีนกับไพริดอซอลในยีสต์ (Snell, 1949) ได้เป็นที่ทราบกันมาบ้างแล้วเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยวิตามินเช่นกรดโฟลิคหรือโฟลินิคที่ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัม/ม.ล. สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของ **Lactobacillus bulgaricus** ได้อย่างสมบูรณ์ (Rogosa et al., 1961)

สารซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ต่าง ๆ อาจเป็นสิ่งแรกที่ปรากฏว่าเป็นปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโต ส่วนปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตอย่างอื่นที่สำคัญคือ ทิวรีน ไพริมิดีน อีมีน (Koser, 1968) และโพลีอะมีน พูทรีสซีน สเปอร์มิดีน (Cohen, 1971)

จากการศึกษาถึงบทบาทของฮอร์โมนอินซูลินที่ต้องการใน **HeLa cell** ของมนุษย์ (Blaker et al., 1971) และฮอร์โมน 2, 4 -**dichlorophenoxyacetic acid** ซึ่งต้องการในเซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงไว้ (Yasuda et al., 1972) แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนเหล่านี้ทำหน้าที่คล้ายปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตในสื่อกลางอาหาร ความต้องการอินซูลินของ **HeLa cell** อาจถูกลืมได้ง่ายเมื่อนำเซลล์เหล่านี้ออกจากสื่อกลางอาหารสมบูรณ์แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสื่อกลางอาหารขั้นต่ำเซลล์จะยังไม่แสดงอาการขาดแคลนอินซูลิน (เซลล์แสดงการขาดแคลนอินซูลินโดยมีอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตกลงอย่างเห็นได้ชัด) จนกระทั่งภายหลังจากชั่วอายุที่สิบสาม ผลกระทบเช่นนี้แสดงว่าการขาดแคลนปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตบางครั้งอาจถูกชี้แสดงได้โดยการลดลงความเร็วในการเจริญเติบโตมากกว่าลดพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต

12.5 ความต้องการฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสปกติมักถูกใช้ในรูปของสารอนินทรีย์ฟอสเฟตแต่บางครั้งก็ถูกใช้ในรูปของสารอินทรีย์ฟอสเฟตเช่น กรีซีรอฟอสเฟตและฟอสโฟลิปิด ฟอสเฟตส่วนใหญ่ถูกใช้รวมเข้าไปอยู่ในกรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิปิดและโพลีเมอร์ของผนังเซลล์ บางครั้งฟอสฟอรัสก็อาจถูกเก็บรักษาไว้ภายในเซลล์ในรูปของโพลีเมตาฟอสเฟต (**Markham & Byrne, 1969**) มีเพียงส่วนน้อยของฟอสเฟตทั้งหมดเท่านั้นที่ปรากฏอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ฟอสเฟตที่แพร่กระจายได้เช่น **ATP**

ปริมาณฟอสฟอรัสในเซลล์แบคทีเรียมีทั้งหมดประมาณ 1.5% ของชีวมวลแห้ง อย่างไรก็ตามปริมาณอาจเพิ่มขึ้นตามอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงผกผันกลับกันกับอุณหภูมิ การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้มีผลกระทบอย่างมากต่อปริมาณอาร์เอนเอในเซลล์ (**Tempest, 1969**) ในแบคทีเรียมีปริมาณสัมพันธ์แตกต่างกันระหว่างจำนวนของแมกนีเซี่ยม โปแตสเซี่ยม ฟอสเฟต และอาร์เอนเอ จึงถูกใช้เป็นลักษณะประจำของแบคทีเรียต่างหมู่กัน (**Tempest, 1969**) เช่น ในแบคทีเรียแกรมลบมีสัดส่วนโมเลกุลาร์ของ **Mg:K:RNA nucleotide:PO_4** ใกล้เคียงกับ 1:4:5:8 และเป็นอิสระจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต อุณหภูมิ และซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต ที่แตกต่างกันคือแบคทีเรียแกรมบวกมีสัดส่วนของ **Mg:K:RNA nucleotide:PO_4** เป็นประมาณ 1:13:5:13 เว้นแต่เมื่อใช้ฟอสเฟตเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตก็จะมีสัดส่วนเป็นประมาณ 1:4:5:8 เช่นเดียวกันกับสำหรับแบคทีเรียแกรมลบ ปริมาณฟอสเฟตและโปแตส-เซี่ยมที่สูงกว่าในแบคทีเรียแกรมบวกอาจเนื่องจากมีกรดเทอิโคอิคเกิดขึ้นในผนังเซลล์เมื่อมีฟอสเฟตจำนวนมากเกินพอ อย่างไรก็ตามเมื่อการเจริญเติบโตถูกกำหนดจำกัดด้วยฟอสเฟต โพลีเมอร์ของเทอิโคอิคจะถูกทดแทนด้วยกรดเทอิคูโรนิคซึ่งปราศจากฟอสเฟต

12.6 ความต้องการโปแตสเซี่ยมและโซเดี่ยม

ความต้องการโปแตสเซี่ยมเพื่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีความคล้อยตามพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตอย่างหยาบ ๆ คือประมาณ 60 กรัมชีวมวล/

กรัมโปแตสเซี่ยม โปแตสเซี่ยมจำนวนมากดูเหมือนว่ามีการเกาะรวมตัวอยู่กับอาร์เอนเอ (Tempest, 1969) ทั้งนี้เนื่องจากความต้องการโปแตสเซี่ยมถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้โดยปัจจัยเช่นอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตซึ่งทำให้ปริมาณอาร์เอนเอของชีวมวลเพิ่มขึ้น ความต้องการโปแตสเซี่ยมอาจเปลี่ยนแปลงยกตัวอย่างกับค่าพีเอช เช่นใน **Klebsiella** ปริมาณโปแตสเซี่ยมเพิ่มขึ้นประมาณ 30% เมื่อลดค่าพีเอชของสื่อกลางอาหารจาก 7 เป็น 6 (Eddy et al., 1951) ปริมาณโปแตสเซี่ยมในแบคทีเรียบางชนิดอาจถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้ถึงสามเท่าโดยเพิ่มปริมาณของโซเดี่ยมคลอไรด์ในสื่อกลางอาหาร(Tempest & Merrs,1968) สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเนื้อเยื่อนอกร่างกายจะต้องมีค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของโปแตสเซี่ยมไอออนถึงระดับหนึ่ง (4×10^{-4} M) เสียก่อนจึงจะเจริญเติบโตได้และเพื่อให้ได้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุดจะต้องทำให้มีความเข้มข้นของโปแตสเซี่ยมไอออนถึงระดับไม่น้อยกว่า 5.3×10^{-4} M (Birch & Pirt, 1971) ขีดเริ่มต้นความเข้มข้นของโภชนาการหรือสารอาหารดูเหมือนว่าไม่มีสิ่งใดเสมอเหมือนกับของโปแตสเซี่ยมและแมกนีเซี่ยมไอออนในการเจริญเติบโตของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม มีโลหะอัลคาไลอย่างอื่นเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถใช้ทดแทนโปแตสเซี่ยมได้คือรูบิเดี่ยม(Eddy & Hinshelwood, 1951)แต่ก็ทำให้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุดลดลงด้วย ผลกระทบจากโปแตสเซี่ยมไอออนอาจถูกหักล้างด้วยแอมโมเนี่ยมไอออน(Dicks & Tempest, 1967)โปแตสเซี่ยมไอออนอาจกระทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์และบางครั้งก็กระทำหน้าที่เป็นแคทไอออนในโครงสร้างของอาร์เอนเอและในโครงสร้างที่เป็นแอนไอออนิคอย่างอื่นภายในเซลล์

ความต้องการโซเดี่ยมไอออนเพื่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ยังไม่ค่อยได้ถูกศึกษามากนัก เนื่องจากมีความยากลำบากในการที่จะทำให้สื่อกลางอาหารปราศจากโซเดี่ยมไอออนแต่เข้าใจว่าจุลินทรีย์มีความต้องการโซเดียมไอออนมากโดยเฉพาะพวกฮาโลฟิลิคแบคทีเรีย ความต้องการโซเดียมในฐานะเป็นธาตุปลีกย่อยจะได้กล่าวถึงต่อไปอีกในตอนที่ 12.9.2

12.7 ความต้องการแมกนีเซี่ยม

พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากแมกนีเซี่ยมไอออนอาจเปลี่ยนแปลงได้จากประมาณ 300 ถึง 900 กรัมชีวมวลแห้ง/กรัมแมกนีเซี่ยมและเป็นสัดส่วนกลับกันกับจำนวนอาร์เอนเอในชีวมวล (**Tempest, 1969**) แมกนีเซี่ยมจะปรากฏอยู่ในคลอโรฟิลล์ของพืชและสาหร่าย **Birch & Pirt** (1971) ได้สังเกตุว่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ไว้นอกร่างกายจำเป็นต้องมีความเข้มข้นของแมกนีเซี่ยมไอออนสูงถึงระดับหนึ่ง (5×10^{-5} M Mg^{2+})) เสียก่อนจึงจะมีการเจริญเติบโตเกิดขึ้นได้เช่นเดียวกันกับของโปแตสเซี่ยมไอออนและเพื่อให้ได้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุดจำเป็นจะต้องมีความเข้มข้นของแมกนีเซี่ยมสูงถึงประมาณ 2×10^{-4} M Mg^{2+}

ลักษณะของการขาดแคลนแมกนีเซี่ยมในการหมักแบบคงที่ทางเคมีของเชื้อ **Agrobacterium tumefaciens** คือทำให้เกิดการกวัดแกว่งเป็นอย่างมากในความเข้มข้นของชีวมวลอันเป็นผลเนื่องมาจากการกวัดแกว่งของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต (**Kurowski et , al., 1973**)

12.8 ความต้องการกำมะถัน

พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากกำมะถันจะมีค่าประมาณ 300 กรัมชีวมวลแห้ง/กรัมกำมะถัน กำมะถันปกติมักถูกจัดเตรียมให้แก่จุลินทรีย์ในรูปของสารอนินทรีย์คือซัลเฟตหรืออยู่ในรูปของสารอินทรีย์คือ ซีสเทอีน หรือเมไทโอนีน ภายใต้สภาวะที่มีอากาศซีสเทอีนเกือบถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นซีสตีนได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามซีสตีนปกติสามารถใช้ทดแทนซีสเทอีนได้

แหล่งกำมะถันส่วนใหญ่ถูกใช้เพื่อจัดเตรียมกำมะถันให้แก่กรดอะมิโนคือแอล–ซีสเทอีน และแอล–เมไทโอนีน แหล่งกำมะถันบางส่วนจำนวนเล็กน้อยก็ถูกใช้เพื่อจัดเตรียมหมู่กำมะถันให้แก่โคเอนไซม์บางชนิด เช่น ไบโอติน, โคเอนไซม์ เอ, เฟอร์รีดอซิน, กรดลิโปอิค และไทอะมีน การเจริญเติบโตที่ถูกจำกัดโดยกำมะถันอาจลด

การสังเคราะห์สารประกอบกุญแจของกำมะถันเหล่านี้และมีผลต่อการทำงานต่าง ๆ ภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่นการเจริญเติบโตที่ถูกจำกัดกำมะถันของยีสต์ทำให้สูญเสียตำแหน่งหนึ่งของขบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอรีย์เลชั่นในลูกโซ่การหายใจ ผลเช่นนี้คล้ายกันกับการเจริญเติบโตที่ถูกจำกัดด้วยธาตุเหล็ก

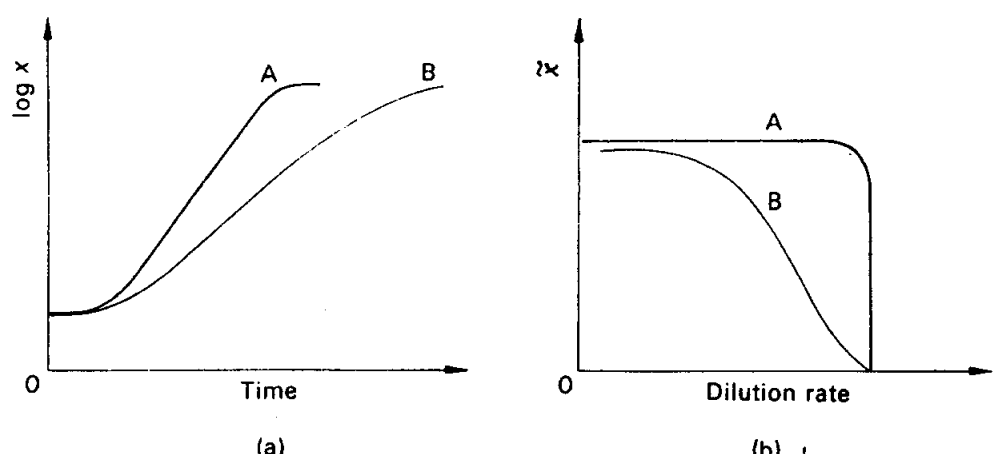
12.9 ธาตุปลีกย่อย

12.9.1 ผลกระทบโดยทั่วไปจากธาตุปลีกย่อย

ธาตุปลีกย่อยที่ถูกค้นพบว่ามีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตหรือต่อความต้องการของจุลินทรีย์ได้ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 12.2 ธาตุต่าง ๆ เหล่านี้ตกอยู่ในระหว่างช่วงของอะตอมมิคนัมเบอร์ที่ 4 (**beryllium**) ถึง 74 (**tungsten**) แต่เกือบทั้งหมดอยู่ในลำดับของอะตอมมิคนัมเบอร์ระหว่าง 4 ถึง 35 โดยทั่วไปความต้องการธาตุปลีกย่อยมักเป็นที่ทราบกันในเชิงคุณภาพเท่านั้นไม่อาจทราบถึงปริมาณได้ ด้วยเหตุนี้จึงมักถูกเติมลงไปในสื่อกลางอาหารอย่างตามอำเภอใจ โดยปกติก็เป็นการยากที่จะแสดงให้เห็นถึงความต้องการธาตุ-ปลีกย่อยของจุลินทรีย์ เนื่องจากมักมีปะปนเข้ามากับส่วนประกอบอย่างอื่นในสื่อกลางอาหารด้วยปริมาณซึ่งเพียงพอแล้ว ความพยายามเพื่อตรวจสอบพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากธาตุปลีกย่อยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างกว้างขวางกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตและสภาวะอื่น ๆ (**Light, 1972**) จากการตรวจสอบอย่างหยาบของปริมาณความต้องการธาตุปลีกย่อยบางชนิดที่ค่อนข้างสำคัญคือ **Ca 0.10, Fe 0.015, Mn 0.005, Zn 0.005, Cu 0.001, Co 0.001, Mo 0.001** (กรัมของธาตุ/100 กรัมชีวมวลแห้ง)

การขาดแคลนธาตุปลีกย่อยในการหมักแบบเก็บกักมีผลในการจำกัดหรือลดอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตมากกว่าจำกัดหรือลดความเข้มข้นของชีวมวลดังแสดงในรูปที่ 12.2 (**a**) ผลกระทบเช่นนี้พบได้จากการเจริญเติบโตที่ขาดแคลนธาตุเหล็กของ **Agrobacterium tumefaciens** (**Kurowski & Pirt, 1971**) และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (**Birch & Pirt, 1970**) การขาดแคลนธาตุปลีกย่อยในการหมักแบบคงที่

ทางเคมีถูกแสดงออกโดยการลดค่าที่สถานะมั่นคงของชีวมวลเมื่อเพิ่มอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต แสดงว่าพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงกลับกันกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต แต่ไม่เปลี่ยนแปลงอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤตดังรูปที่ 12.2 (b) การขาดแคลนแมนกานีสของเชื้อ **Agrobacterium** มีผลต่อการเจริญเติบโตทำนองเดียวกันกับที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 12.2 (a) และ (b) (**Pirt, 1975 p., 125**) ความต้องการธาตุปลีกย่อยอาจเพิ่มขึ้นเป็นหลายเท่าเมื่อเชื้อจุลินทรีย์ถูกปีบคั้น เช่นเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเกินกว่าค่าที่เหมาะสม (**Hutner, 1972, p. 338**) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ได้กลวิธีเพื่อตรวจสอบคุณลักษณะความต้องการธาตุปลีกย่อยของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายขึ้น พิษจากความเข้มข้นของธาตุปลีกย่อยยังไม่เป็นที่ทราบกันมากนักถึงแม้ว่าโดยทั่วไปจะอยู่ในลำดับประมาณ 10^{-4} M การขัดแย้งกันระหว่างไอออนของโลหะอาจเกิดขึ้นได้ ตัวอย่างเช่น Mn^{2+} กับ Zn^{2+} สำหรับสายพันธุ์ **Rhizobium** (**Wilson & Reisenauer, 1970**) และผลกระทบอาจเกิดขึ้นจากไอออนต่างชนิดกันได้อีกหลายอย่าง (**Dixon & Webb, 1967, p. 421**)



รูปที่ 12.2 Effects of trace element deficiency on growth of microorganisms in (a) batch culture and (b) chemostat culture: x = biomass in batch; $\bar{x}$ = steady state biomass in chemostat. Line A, optimum amount of trace element; line B, deficiency of trace element.

12.9.2 ผลกระทบจากธาตุปลีกย่อยแต่ละอย่างโดยเฉพาะ

ธาตุปลีกย่อยหมู่ ที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 12.2 มักถูกพบว่ามีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต แคลเซียมเป็นแคตไอออนของเกลือไดพิโคลิเนตที่ปรากฏอยู่ในสปอร์ของ **Bacillus** สายพันธุ์ต่าง ๆ และแคลเซี่ยมก็เป็นโคแฟคเตอร์สำหรับเอนไซม์อัลฟ่า-อะมายเลส

ตารางที่ 12.2 Trace elements which may be required in microbe and cell culture (Hutner, 1972; Tempest, 1969; Steinberg, 1956; Arnon, 1938)

A	Elements which are frequently essential for growth Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn
B	Elements which are, rarely, essential for growth B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, I
C	Elements which may be, rarely, essential for growth Be, F, Sc, Ti, Ga, Ge, Br, Zr, W

Note: each group of elements is arranged in order of increasing atomic number

แมนกานีสโดยทั่วไปมักถูกพิจารณาว่าเป็นสิ่งกระตุ้นการเจริญเติบโตของแลคติคแอสิดแบคทีเรียและร่วมอยู่ในขบวนการสร้างสปอร์ของ **Bacillus** สายพันธุ์ต่าง ๆ การขาดแคลนแมนกานีสใน **Agrobacterium tumefaciens** ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของซูโครสไปเป็น 3-คีโตซูโครสแทนที่จะถูกออกซิไดซ์ไปได้อย่างสมบูรณ์ (**Kurowski et al.,** 1973) การขาดแคลนธาตุเหล็กและแมนกานีสมักปรากฏว่าทำให้เกิดการสะสมกรดซิตริคโดย **Aspergillus niger** (**Choudhary & Pirt, 1966**)

โคแฟคเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ในการรีดิวซ์มีความต้องการธาตุเหล็กเป็นอย่างมาก เช่น ฮีมซึ่งเป็นรงควัตถุของไซโตโครมและเอนไซม์คาตาเลส เฟอร์รีดอกซินและฟลาโวโปรตีน การจำกัดธาตุเหล็กสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โคแฟคเตอร์ต่าง ๆ เหล่านี้ได้และทำให้การทำงานต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้รับความเสียหาย (**Light,** 1972) โคแฟคเตอร์ที่ต้องการธาตุเหล็กแต่ปราศจากธาตุเหล็กอาจถูกขับออกนอกเซลล์ (**Townsley & Neilands, 1975**) การขาดแคลนธาตุเหล็กเป็นสาเหตุทำให้ต้องมีการขับสารประกอบซึ่งปกติมีธาตุเหล็กเกาะติดอยู่ออกมานอกเซลล์โดยแบคทีเรียและฟังไจบางชนิด

(Hutner, 1970; Snow, 1970) สารประกอบที่ต้องเกาะรวมตัวกับธาตุเหล็กเหล่านี้มีความดึงดูด (chelate) กับ Fe^{3+} สูงมาก (มีค่าลอกความถาวรคงที่ > 30) และอาจทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ (ionophore) เพื่อขนส่งธาตุเหล็กผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ได้ (Ratledge, 1971) การขาดแคลนธาตุเหล็กในเชื้อ Corynebacterium diphtheria เป็นสภาวะที่จำเป็นต่อการขับสารพิษ (toxin(ออกมานอกเซลล์ Righelato & Van Hemert, 1969a) การขาดแคลนธาตุเหล็กกระตุ้นให้ยีสต์มีการผลิตไรโบฟลาวิน (Demain, 1972 a) และยังได้เสนอว่าการขาดแคลนธาตุเหล็กอาจทำให้มีการถ่ายทอดอีเล็กตรอนผ่านฟลาโวโปรตีนแทนการส่งผ่านโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ

โคบอลต์เป็นส่วนหนึ่งอยู่ในโมเลกุลของวิตามิน บี12 หรือโคบาลามินที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยพวกโปรคารีโอตต่าง ๆ

ทองแดงปรากฏอยู่ในเอนไซม์ออกซิเดสขั้นสุดท้ายของลูกโซ่การหายใจของยีสต์ การขาดแคลนทองแดงหรือเหล็กเป็นสาเหตุทำให้ไมโตคอนเดรียของยีสต์มีขนาดโตขึ้น (Davison et al., 1972) การทำให้ยีสต์ขาดแคลนทองแดงเป็นการคัดเลือกยีสต์ผ่าเหล่าซึ่งปกติขาดเอนไซม์ออกซิเดสในขั้นสุดท้าย (Downie & Garland, 1972) แต่ใช้เส้นทางการหายใจที่ไม่เหมือนกับยีสต์อื่น สำหรับเอนไซม์เพ็บติเดสอาจมีทองแดงหรือสังกะสีไอออนอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ก็ได้

ธาตุปลีกย่อยหมู่ B ในตารางที่ 2 เป็นพวกซึ่งปกติจุลินทรีย์ไม่แสดงความต้องการออกมาแต่บางโอกาสก็อาจมีความจำเป็นต่อการทำหน้าที่พิเศษโดยเฉพาะบางอย่าง เช่น บอเรตถูกพบว่ามีความจำเป็นการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ Candida ในนอร์มอลพาราฟิน (Sato et al., 1972) Rhodopseudomonas spheroides ต้องการโซเดี่ยมไอออนในปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญเติบโต (Sistrom, 1960) O'Brien และ Stern (1969) พบว่าการเจริญเติบโตแบบไม่ต้องการออกซิเจนของ Klebsiella aerogenes ในสื่อกลางอาหารซิเตรตมีความต้องการโซเดี่ยมไอออนเป็นจำนวนมาก (0.1 M) โซเดี่ยมไอออนมีความจำเป็นต่อเอนไซม์ออกซาลาอะซีเตตดีคาร์บอกซายเลสแต่ความต้องการนี้จะไม่ปรากฏเมื่อเจริญเติบโตอยู่ในน้ำตาลกลูโคส

ซีลีไนตหรือซีลีไนต(ไม่ใช่ซีลีเนต) มีความจำเป็นต่อการเกิดเอนไซม์ฟอร์เมตดีไฮโดรจีเนสใน **Escherichia coli** ที่เจริญเติบโตอยู่ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน อย่างไรก็ตามการขาดแคลนซีลีเนี่ยมก็ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ **E. coli** (Enoch & Lester, 1972)

นิคเกิลไอออนมีความจำเป็นต่อ **Hydrogenomonas** ซึ่งออกซิไดส์ไฮโดรเจนเพื่อให้ได้พลังงาน (Bartha & Ordal, 1965)

โมลิบเดนั่มที่ถูกใช้ในรูปของโมลิบเดทเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในแบคทีเรียที่จับยึดแกสไนโตรเจน และของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสที่จำเป็นต่อการใช้ไนเตรตไนโตรเจนโดยแบคทีเรียและพืงใจ วานาเดี่ยมปรากฏว่าได้ผลน้อยมากที่จะใช้ทดแทนโมลิบเดนั่ม

ไอโอดีนไอออนมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ **Candida** ในนอร์มอล-พาราฟิน (Sato et al., 1972)

ความรู้เกี่ยวกับความต้องการชาตุปลีกย่อยและผลกระทบจากการขาดแคลนชาตุปลีกย่อยต่อจุลินทรีย์จำเป็นต้องปรับปรุงวิธีการศึกษาเพื่อควบคุมปริมาณชาตุปลีกย่อยในสื่อกลางอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

12.10 การกำจัดชาตุปลีกย่อยออกจากสื่อกลางอาหาร

ชาตุปลีกย่อยอาจถูกกำจัดออกจากสารละลายได้โดยการทำให้ตกตะกอนในรูปของไฮดรอกไซด์ ฟอสเฟต หรือคาร์โบเนต (Steinbery, 1956) และในรูปของเฟอร์โรไซยาไนด์ (Choudhary & Pirt, 1966) วิธีการอย่างอื่นก็คือการสกัดออกด้วยสารทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ (Donald, 1952) การดูดซับด้วยอลูมินา (Ratledge & Chaudhry, 1971) และการตรึงด้วยคีเลติ้งเรซิ่น (Noguchi & Johnson, 1961) การขาดแคลนชาตุปลีกย่อยบางครั้งก็อาจทำให้เกิดขึ้นได้โดยการเติมสารตรึงโลหะพวกคีเลติ้งเอเจนต์ (chelating agent) ลงไปในสื่อกลางอาหาร ตัวอย่างเช่น การขาดแคลน

ธาตุเหล็กซึ่งกระตุ้นให้เกิดการผลิตไรโบฟลาวินอย่างเหลือเฟือในยีสต์บางชนิดถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยเติมออร์โธ-ฟีแนนโทรลีนลงในสื่อกลางอาหาร (Domain, 1972)

12.11 การตรึงไอออนของโลหะโดยการคีเลชั่น

12.11.1 คำนำ

การคีเลชั่น (Chelation) หมายถึง การดึงดูดกันภายในโมเลกุลระหว่างขั้วหรือตำแหน่งซึ่งค่อนข้างมีประจุเป็นบวกและลบแยกต่างกันทำให้โมเลกุลโค้งงอเป็นวงทำนอง เดียวกันกับการบิดพันเป็นเกลียวด้วยไฮโดรเจนบอนด์ในเส้นโพลีเพ็บไทด์หรือโปรตีน การตรึงไอออนของโลหะโดยวิธีการคีเลชั่นเป็นการนำเอาไอออนโลหะซึ่งมีประจุเป็นบวกเข้ามารวมอยู่ในโมเลกุลโดยการดูดดึงของตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุลซึ่งค่อนข้างมีประจุเป็นลบทำให้โมเลกุลโค้งงอเป็นวงไอออนของโลหะหลุดออกมาเป็นอิสระได้ยาก ในสื่อกลางอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดความเข้มข้นของไอออนโลหะที่นอกเหนือจากไอออนของโลหะอัลคาไลแล้วอาจถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปได้โดยวิธีการคีเลชั่น เนื่องจากในสื่อกลางอาหารสามัญหลายชนิดมีส่วนประกอบและผลผลิตของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนและกรดไฮดรอกซีต่าง ๆ ซึ่งทำหน้าที่เป็นสิ่งรวมตัว(Complexant) กับไอออนโลหะเหล่านั้นได้ เพื่อป้องกันการตกตะกอนและควบคุมความเข้มข้นของไอออนโลหะปลีกย่อยจึงมักจำเป็นต้องตรึงไอออนของโลหะไว้ด้วยสารคีเลติ้ง เอเจนท์ คีเลติ้ง เอนเจนท์ของโลหะมักเป็นสารประกอบพวกกรดโพลี่เบสิค เช่น ethylenediamine tetra-acetic acid ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ของโลหะไอออน

12.11.2 ความถาวรในการตรึงโลหะโดยวิธีการคีเลชั่น

ไอออนโลหะ (M) มีการรวมตัวกลับไปมาได้กับสิ่งรวมตัวที่เรียกว่า ลิแกนด์(L) เช่น คีเลติ้ง เอเจนท์ ดังสมการ

$$M + L \rightleftharpoons ML$$

ในที่นี้ประจุของแคทไอออนและลิแกนด์ถูกละไว้ ค่าความถาวรคงที่ (stability constant) ของสารประกอบซับซ้อนที่ได้จากสมการคือ

$$K = [ML]/[M][L] \qquad 12.4$$

ที่อยู่ภายในวงเล็บเหลี่ยมหมายถึงความเข้มข้นของสารปฏิกริยา (reactant) ค่าความถาวรคงที่ก็คือส่วนกลับของค่าการแตกตัวคงที่ (dissociation constant) ในที่นี้ค่าของ K ที่สูงขึ้นก็จะหมายถึงการดูดดึงของลิแกนด์ต่อไอออนโลหะมีมากขึ้น ใส่ค่าลอกและกำหนดให้ $pM = -\log [M]$ สมการที่ 12.4 จะกลายเป็น

$$pM = \log K + \log \frac{[L]}{[ML]} \qquad 12.5$$

12.11.3 ผลกระทบจากไฮโดรเจนไอออนต่อค่า pM

สารคีเลติ้งเอเจนต์อาจถูกถือได้ว่าเป็นกรดอย่างหนึ่งซึ่งมีสูตรโดยทั่วไปคือ H_mL ในที่นี้ m หมายถึงจำนวนของไฮโดรเจนไอออนที่สามารถรวมตัวอยู่กับลิแกนด์ (L) ได้ ดังนั้นไฮโดรเจนไอออนจึงแข่งขันกันกับโลหะไอออนเพื่อจับรวมตัวกับลิแกนด์

ให้ L_u = ผลรวมของสารรวมตัวทุกรูปแบบของลิแกนด์ที่ไม่ได้รวมตัวอยู่กับโลหะไอออน ดังนั้น

$$L_u = L + HL + H_2L + \ldots + H_mL \qquad 12.6$$

โดยที่ประจุของลิแกนด์ถูกละไว้ จะได้ว่า

$$L_u = \alpha L \qquad 12.7$$

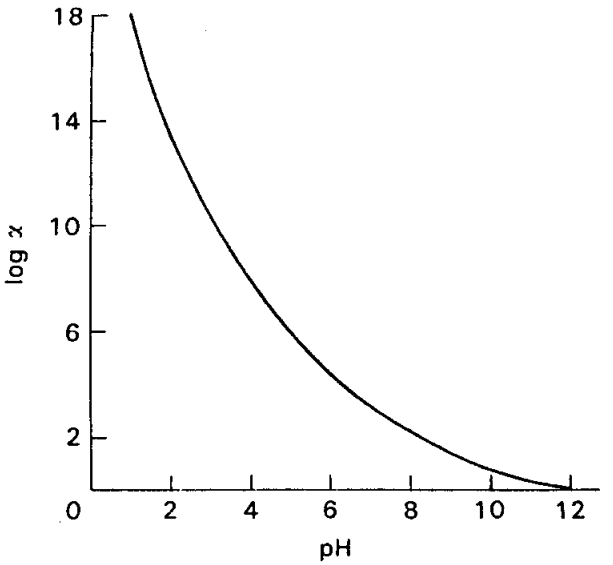
ซึ่ง $\alpha > 1$ ค่าของ α อาจถูกแสดงออกมาได้ในรูปของความถาวรคงที่สำหรับกรดต่าง ๆ คือ HM, H_2M ฯลฯ และความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (Flaschka, 1964, p. 74) แทนค่าสำหรับ [L] ในสมการที่ 12.5 จะได้ว่า

$$pM = \log K - \log \alpha + \log \frac{[L_u]}{[ML]} \qquad 12.8$$

กำหนดให้ $\log (K/\alpha) = \log K_{app}$ สมการที่ 12.8 จึงกลายเป็น

$$pM = \log K_{app} + \log \frac{[L_u]}{[ML]} \qquad 12.9$$

ในสารละลายต่างแก่ค่าของ $\alpha \approx 1$ แต่จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของความเป็นกรด และที่ค่า pH ต่ำก็จะลดค่าของ pM ลงเป็นอย่างมาก ผลของ pH ต่อค่า $\log \alpha$ ของ EDTA ได้แสดงไว้ในรูปที่ 12.3



รูปที่ 12.3 The effect of pH value on the stability constants of EDTA complexes: $\log K_{app} = \log K - \log \alpha$. (Redrawn from Flaschka, 1964; permission of Pergamon Press)

12.11.4 การคำนวนหาค่า pM

ให้ $[L_T]$= ปริมาณทั้งหมดของสิ่งรวมตัว (ทั้งส่วนที่ถูกใช้รวมตัวแล้วและส่วนที่ยังเป็นอิสระ) และทำนองเดียวกันให้ $[M_T]$= ปริมาณทั้งหมดของไอออนโลหะ เมื่อมีไอออนโลหะปรากฏอยู่ด้วยปริมาณซึ่งมากเหลือเฟือ $[M_T] > [L_T]$ สำหรับสิ่งรวมตัวพลังสูงอาจกำหนดความเข้มข้นของโลหะไอออนอิสระได้ว่า

$$[M] = [M_T] - [L_T] \qquad 12.10$$

เมื่อสิ่งรวมตัวมีปริมาณมากเหลือเฟือ $[L_T] > [M_T]$ จะแทนค่าในสมการที่ 12.9 ได้ว่า $[L] = [L_T] - [M_T]$ และ $[ML] = [M_T]$ จึงได้ว่า

$$pM = \log K_{app} + \log \left\{ \frac{[L_T] - [M_T]}{[M_T]} \right\} \qquad 12.11$$

เมื่อปริมาณทั้งหมดของสิ่งรวมตัวและโลหะไอออนเท่ากันคือ $[L_T] = [M_T]$ แต่เนื่องจาก

$$[L_u] = [L_T] - \{[M_T] - [M]\} \qquad 12.12$$

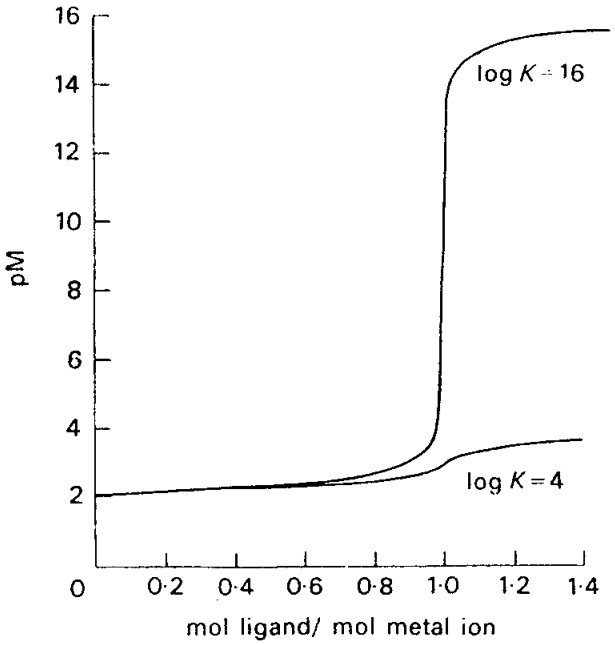
ดังนั้น

$$[L_u] = [M] \qquad 12.13$$

แทนค่า $[L_u]$ ในสมการที่ 12.9 และให้ $[ML]=[M_T]$ จะได้ว่า

$$pM = \tfrac{1}{2}\{\log K_{app} - \log [M_T]\} \qquad 12.14$$

การเปลี่ยนแปลงค่าของ pM เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณสิ่งรวมตัวและผลจากความแตกต่างกันของค่าความถาวรคงที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 12.4 ด้วยปริมาณของสิ่งรวมตัวซึ่งมากเกินพอค่าที่สูงขึ้นของ pM จะประมาณใกล้เคียงกันกับ $\log K_{app}$ ในกรณีของลิแกนด์ที่ทำให้เกิดสารประกอบซับซ้อนในรูปของ ML_2 ค่าความถาวรคงที่ถูกกำหนดได้เป็น β_2 (ตารางที่ 12.3) และเมื่อลิแกนด์มีปริมาณมากเกินพอค่าของ pM จะเข้าใกล้กับ $\log \beta_2$



รูปที่ 12.4 Effect of increasing amount of chelating agent on the pM for two metal ions with different stability constants (K). Total metal ion present (free and bound), 10^{-2} M.

12.11.5 ผลกระทบจากโลหะไอออนสองชนิดแตกต่างกัน

โลหะไอออนชนิดที่สองจะแข่งขันกันกับโลหะไอออนชนิดแรกเพื่อยื้อแย่งกันจับกับสิ่งรวมตัว ถ้า K_x และ K_y เป็นค่าความถาวรคงที่ของโลหะไอออน M_x และ M_y ตามลำดับ ดังนั้นสมการความเข้มข้นของ L จะได้จากสมการที่ 12.4 ว่า

$$\frac{[M_xL]}{[M_yL]} = \frac{K_x}{K_y}\cdot\frac{[M_x]}{[M_y]} \qquad 12.15$$

จากสมการแสดงว่าโลหะไอออนทั้งสองชนิดนี้มีการแข่งขันกันจับกับสิ่งรวมตัวอย่างคู่คี่เสมอกัน เมื่อ $K_x \approx K_y$ แต่ถ้า $K_x \gg K_y$ และปริมาณทั้งหมดของไอออนโลหะแต่ละอย่างและของลิแกนด์เท่ากันจะดูเสมือนว่า M_x เท่านั้นที่ถูกตรึงไว้ได้ นอกจากนี้ถ้าปริมาณของสิ่งรวมตัวหรือลิแกนด์ในส่วนผสมของโลหะไอออนทั้งสองเพิ่มขึ้นโลหะไอออนทั้งสองจะถูกตรึงไว้ในลำดับซึ่งที่มีค่าความถาวรคงที่สูงสุดก่อนแล้วโลหะไอออนที่มีค่าความถาวรคงที่ต่ำจึงถูกตรึงไว้ในลำดับต่อมา

12.11.6 <u>ผลกระทบจากลิแกนด์สองชนิดแตกต่างกัน</u>

ในสื่อกลางการหมักมักมีส่วนประกอบมากกว่าหนึ่งชนิดที่สามารถเป็นคีเลติ้ง-เอเจนต์หรือเป็นสิ่งรวมตัวกับโลหะไอออนได้ และจุลินทรีย์เองก็ยังอาจขับหรือมีสิ่งที่สามารถรวมตัวกับโลหะได้อีกด้วย สมมุติว่า K_p= ค่าความถาวรคงที่ของโลหะไอออนกับลิแกนด์ L_p และ K_q= ค่าความถาวรคงที่กับลิแกนด์ L_q สมการความเข้มข้นของโลหะไอออนอิสระในแต่ละกรณีจะได้จากสมการที่ 12.4 ว่า

$$\frac{[ML_p]}{[ML_q]} = \frac{K_p}{K_q} \cdot \frac{[L_p]}{[L_q]} \qquad 12.16$$

และที่ตามมาคือถ้า K_p และ K_q มีค่าประมาณเท่า ๆ กันสิ่งรวมตัวทั้งสองจะมีการแข่งขันกันจับกับไอออนของโลหะอย่างคู่คี่เสมอกัน แต่ถ้า $K_p \gg K_q$ และมีลิแกนด์แต่ละอย่างมากเกินพอโลหะไอออนส่วนใหญ่จะจับรวมตัวกับ L_p

12.11.7 <u>บัฟเฟอร์ของโลหะในสื่อกลางการหมัก</u>

ค่าความถาวรคงที่ของคีเลติ้งเอเจนต์ที่มีความสำคัญทางชีววิทยาได้ถูกให้ไว้ในตารางที่ 12.3 คีเลติ้งเอเจนต์ที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์ของโลหะในสื่อกลางการหมักไม่ควรถูกใช้ในการเมตาโบลิซึมได้ ลิแกนด์ที่เป็นสารอินทรีย์เช่น **CDTA** และ **EDTA** มักมีความทนทานต่อการกระทำทางเมตาโบลิซึม โพลีฟอสเฟตเสื่อมสลายได้ง่ายด้วยความร้อนจึงควรถูกทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีการกรอง เป็นที่น่าเสียดายที่ยังมีรายละเอียดน้อยมากเกี่ยวกับผลกระทบจากพีเอชต่อค่าความถาวรคงที่ รูปที่ 12.3 แสดงให้เห็นว่าที่ค่าพีเอชจะมีค่า $\log K_{app}$ ของ **EDTA** เท่ากับ $\log K - 3$ ความเฉพาะเจาะจงของคีเลติ้งเอเจนต์

ส่วนใหญ่ที่ได้ให้ไว้ในตารางที่ 12.3 แสดงให้เห็นว่ามีความคึงดูดสูงสุดกับ Fe^{3+} แต่มีความคึงดูดน้อยกับแคลเซี่ยมและแม็กนีเซี่ยม ระดับในการรวมตัวกันกับเหล็กก็ขึ้นอยู่กับว่าเหล็กนั้นอยู่ในสภาพที่เป็นไอออน Fe^{3+} หรือ Fe^{2+} งานการทดลองของ Ratledge (1971) ได้ชี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชอบใช้เหล็กในรูปของเฟอร์ริกไอออน นอกจากนี้ คีเลติ่ง เอเจนต์บางชนิดเมื่อทำให้เกิดสารประกอบซับซ้อนกับโลหะไอออนแล้วจะกลายเป็นสารซึ่งชอบรวมตัวกับลิปิด (lipophilic complex) เช่น EDDHA และ 8-hydroxyquinoline จึงอาจซึมซับผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ได้และช่วยในการนำเอาไอออนโลหะเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (Rubin, 1961)

ตารางที่ 12.3 Stability constants of some chelating agents of importance in culture media

Chelating agent	Log stability constant							
	Fe^{3+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}
EDDHA[2]	33·9	15	9·3	—	14·3	—	7·2	2·9
CDTA[1]	27·5	21·3	18·5	18·9	16·3	14·7	12·5	10·3
EDTA[1]	25·1	18·3	16·3	16·2	14·3	13·6	10·7	8·7
NTA[1]	15·9	12·8	10·5	10·6	8·8	7·4	6·4	7·0
Histidine[1]	—	18·3*	12·9*	13·9*	9·3*	7·7*	—	—
8 Hydroxyquinoline	26·3*	25·4*	17·1*	19·5*	15·0*	13·5*	13·2*	12·0*
1:10 Phenanthroline	14·1*	18·0	17·0*	—	21·0*	7·4*	—	—
2:2′ Dipyridyl	—	17·9†	13·5†	—	17·6†	6·3†	—	—
SSA	14·1	9·4	—	6·5	—	5·3	—	—
Glycine[1]	—	15·2*	9·5*	8·9*	7·8*	4·7*	—	—
Citric acid[1]	11·4	5·9	5·0	5·0	4·4	3·7	3·6	3·3
Polyphosphate	6·5*	5·5*	6·0*	3·0	3·0	5·5*	3·0	3·2

EDDHA = ethylenedinitrilo-*N*,*N*′-bis(2′hydroxyphenyl)-*N*,*N*′-diacetic acid
CDTA = 1:2 diaminocyclohexane-*N*,*N*-tetra-acetic acid
EDTA = ethylenediamine tetra-acetic acid
NTA = nitrilotri-acetic acid
polyphosphate = $[P_nO_{3n+1}]^{(n+2)-}$ where $n \approx 5$
SSA = 5-sulphosalicylic acid

The stability constant is $K = [ML]/[M][L]$ where [ML], [M] and [L] are the concentrations of complex, free metal ion and free ligand respectively

* Stability constant is $\beta_2 = [ML_2]/[M][L]^2$, which is obtained from the equilibrium $M + 2L \rightleftharpoons ML_2$

† Stability constant is $\beta_3 = [ML_3]/[M][L]^3$, which is obtained from the equilibrium $M + 3L \rightleftharpoons ML_3$

[1]Bjerrum *et al.* (1958), Sillén & Martell (1971); [2]Wallace (1962)

12.12 การประกอบสูตรอาหารเพื่อการหมัก

12.12.1 สื่อกลางอาหารชั้นต่ำ

ปริมาณและธรรมชาติขององค์ประกอบต่าง ๆ ในสื่อกลางอาหารอาจถูกแสดงออกได้จากการให้ผลผลิตของเชื้อจุลินทรีย์และอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตที่ต้องการ การตรวจสอบพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตสามารถกระทำได้จากส่วนประกอบเบื้องต้นของชีวมวล และความต้องการแหล่งพลังงานอาจถูกตรวจสอบได้จากความรู้เกี่ยวกับพืชผลหรือประสิทธิภาพการผลิตพลังงานในรูปเอทีพี ตารางที่ 12.4 แสดงถึงส่วนประกอบของสื่อกลางอาหารที่มีองค์ประกอบทางเคมีแน่นอนเพื่อการเจริญเติบโตของ **Klebsiella aerogenes** ซึ่งถูกกำหนดขึ้นเพื่อให้ได้เซลล์แบคทีเรียแห้งเป็นจำนวน 10 กรัม/ลิตร เมื่อมีออกซิเจนมากเกินพอ ในขณะทำการหมักหรือเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ค่าของพีเอชจะตกลงเนื่องจากการใช้แอมโมเนียจึงต้องมีการควบคุมพีเอช เพื่อหลีกเลี่ยงการเติมเกลือแอมโมเนียจำนวนมากลงไปในสื่อกลางอาหารจึงอาจใช้แก๊สแอมโมเนียเติมลงไปโดยการควบคุมพีเอช ในขณะที่แอมโมเนียไอออนถูกใช้ไป สำหรับจุลินทรีย์บางชนิดยูเรียหรือไกลซีนอาจถูกใช้แทนแอมโมเนียเพื่อลดการเปลี่ยนแปลงพีเอชได้ ในการเมตาโบลิซึ่มพิเศษเฉพาะอย่างอาจต้องการสื่อกลางอาหารที่ได้รับการปรับปรุงขึ้นใหม่ ตัวอย่างเช่น ใช้โมลิบเดนัมในรูปของโมลิบเดตเมื่อต้องการให้ไนเตรตถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ถ้ามีผลผลิตอย่างอื่นจำนวนมากเกิดขึ้นนอกเหนือจากชีวมวลด้วยแล้วการเติมซับสเตรตเพื่อให้ได้ผลผลิตนั้นอาจมีความจำเป็นต้องกระทำพร้อมกันไปด้วย การจัดทำให้สารอาหารใดสารอาหารหนึ่งในสื่อกลางอาหารเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตก็จำเป็นต้องลดปริมาณของสารอาหารนั้นจนกระทั่งได้ชีวมวลน้อยกว่าชีวมวลสูงสุดที่เคยได้รับอย่างเห็นได้ชัด

การจัดทำให้สื่อกลางอาหารอุดมสมบูรณ์ยิ่งขึ้นด้วยการเติมกรดอะมิโนและเบสของกรดนิวคลีอิกก็จะเป็นการสำรองน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากสารเหล่านี้สามารถให้ธาตุคาร์บอนแก่เซลล์ได้ด้วยและเพิ่มอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต (**Hernandez & Johnson**, 1967)

สำหรับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่เพาะเลี้ยงไว้การเติมเมทิลเซลลูโลส (0.1%) ซึ่งเฉื่อยชาต่อการเมตาโบลิซึมลงไปในสื่อกลางอาหารขั้นต่ำด้วยจะช่วยลดระยะเวลาในการล้าหลัง (lag) ก่อนการเจริญเติบโตลงได้ (Birch & Pirt, 1970) กลไกเนื่องมาจากผลกระทบซึ่งมีความสำคัญมากเช่นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ตารางที่ 12.4 Composition of a chemically defined medium (P1) to produce *Klebsiella aerogenes* at concentrations up to 10 g dry biomass/l in aerobic culture

Constituent	Elements provided or other function of constituent	Growth yield assumed (g dry biomass/g element)	Mass of constituent (g)
Water (distilled)§	—	—	1000
Glucose	C, energy	1·10	22·7
NH_4Cl	N	8·75	4·37
KH_2PO_4	P+K	39·1 for P 59·5 for K	1·13*
$MgSO_4.7H_2O$	S+Mg	333 for S 430 for Mg	0·232†
$CaCl_2.2H_2O$	Ca	$3·33 \times 10^3$	0·011
$FeSO_4.7H_2O$	Fe	$6·7 \times 10^3$	0·007
$MnSO_4.4H_2O$	Mn	$2·0 \times 10^4$	0·002
$ZnSO_4.7H_2O$	Zn	$2·0 \times 10^4$	0·002
$CuSO_4.5H_2O$	Cu	10^5	0·0004
$CoCl_2.6H_2O$	Co	10^5	0·0004
EDTA, disodium salt, dihydrate	chelation	—	0·394‡

The pH should be adjusted to about 7 with NaOH. To increase the buffering power, sodium phosphates (0·1 M in phosphate) are added, e.g. 0·079 M Na_2HPO_4 + 0·021 M NaH_2PO_4 gives pH 7. However, increasing the Na:K ratio may decrease the yield from potassium. The dissolved oxygen tension should be not lower than 15 mmHg to prevent oxygen limitation. The calculated ideal osmolality of the above medium is 313 milliosmolal. With 0·1 M sodium phosphate buffer pH 7 added, the medium is 592 milliosmolal (ideal), which corresponds to a water activity of 0·99.

* The potassium requirement is met by 0·586 g KH_2PO_4
† The amount is the same for sulphur and magnesium
‡ 1 mole EDTA/mole Mg and other non-alkali metals
§ De-ionized water may contain undefined neutral organic compounds

12.12.2 ความคงทนถาวรของสื่อกลางอาหาร

ปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อความคงทนถาวรของสื่อกลางอาหารมีหลายอย่าง คือ ธรรมชาติขององค์ประกอบต่าง ๆ ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นระหว่างองค์ประกอบ อุณหภูมิโดย

เฉพาะในระหว่างขบวนการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อน พีเอช ออกซิเจน และแสง เป็นการง่ายที่จะพิจารณาถึงผลกระทบของปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ต่อองค์ประกอบสำคัญในสื่อกลางอาหาร

กรดอะมิโนพวก ทริพโตเฟน กลูตามีน และแอสปาราจีน เสื่อมสลายได้ง่ายที่สุดด้วยความร้อน ด้วยสาเหตุนี้จึงไม่ควรทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนแต่ควรทำโดยการกรอง กลูตามีนถูกทำให้สลายตัวได้อย่างสมบูรณ์เป็น γ-**pyrrolidone** ในสารละลายน้ำที่ 100° ซ และพีเอช 7 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือแม้แต่ที่อุณหภูมิ 37° ซ กลูตามีนก็อาจสลายตัวได้ด้วยอัตราค่อนข้างสูง (**Griffiths & Pirt, 1967**)ซีสเตอีนในสภาพที่มีออกซิเจนถูกทำให้เปลี่ยนแปลงเป็นซีสตีนได้อย่างรวดเร็ว ซีสตีนมีการละลายน้ำได้น้อย (ประมาณ 0.2% ที่ 20° ซ) กว่าซีสเตอีนมากอย่างไรก็ตามโภชนาการหรือคุณค่าทางอาหารของซีสเตอีนและซีสตีนสามารถใช้ทดแทนกันได้

เกี่ยวกับวิตามินที่ละลายน้ำได้พวก ไทอะมีน ไรโบฟลาวิน และไพริดอกซิน มีแนวโน้มที่จะสลายตัวได้ง่ายที่สุด ไทอะมีนในสารละลายน้ำซึ่งมีออกซิเจนปรากฏอยู่ที่ 37° ซ จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นสารที่เฉื่อยชาทางชีววิทยาประมาณ 50% ภายในระยะเวลาหนึ่งสัปดาห์ และถูกทำให้สลายตัวในออโตเคลฟ (**autoclave**) ได้ในเวลา 5 นาที ที่ 121° ซ (**Button,** 1969) ไรโบฟลาวินถูกทำให้สลายตัวได้โดยการออโตเคลฟที่ 121° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่พีเอช 7 แต่ค่อนข้างทนทานขึ้นที่พีเอชเป็นกรด ไรโบฟลาวินอ่อนไหวต่อแสงมากแม้แต่แสงที่กระจายอยู่ในห้องที่ 32° ซ ก็อาจถูกทำลายได้ถึง 50% ใน 1 ชั่วโมง (**Koser, 1968**) อย่างไรก็ตาม **Blaker(1971)** กลับพบว่ามีเพียง 13% เท่านั้นที่สูญเสียไปภายในระยะเวลา 157 ชั่วโมง เช่นเดียวกันกับกรดโฟลิกและไพริดอกซินก็เป็นสารซึ่งอ่อนไหวต่อแสงแต่ยังน้อยกว่าไรโบฟลาวิน (**Blaker, 1971**)

น้ำตาลก็มีการสลายตัวได้บ้างและมักร่วมด้วยกับการเกิดเป็นสารสีน้ำตาล (**browning**) เมื่อถูกออโตเคลฟในสภาพที่มีเกลืออนินทรีย์และสารอินทรีย์ปรากฏอยู่ พวกไกลโคไซด์ที่มีหมู่ฟูราโนไซด์ตัวอย่าง เช่นน้ำตาลทรายที่ค่าพีเอชเป็นกรดจะถูกไฮโดรไลสด้วยความร้อน สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยทั่วไปปรากฏการนี้ไม่ก่อให้เกิด

ความเสียหายแต่ในสภาวะที่กำหนดแน่นอนก็จำเป็นต้องหลีกเลี่ยง โดยทั่วไปน้ำตาลต่าง ๆ ในสารละลายบริสุทธิมีความทนทานต่อการออโตเคลฟ

ในบรรดาเกลืออนินทรีย์ต่าง ๆ เกลือแอมโมเนียควรออโตเคลฟที่พีเอชต่ำกว่า 7 มิฉะนั้นแอมโมเนียบางส่วนอาจระเหยออกไป ในสื่อกลางอาหารที่กำหนดจำกัดทางเคมีแน่นอนการสูญเสียส่วนใหญ่ของแม็กนีเซี่ยม, โปแตสเซี่ยม, แอมโมเนีย, โซเดี่ยม และฟอสเฟตไอออนอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการตกตะกอนในรูปของแม็กนีเซี่ยมแอมโมเนียฟอสเฟต แม็กนีเซี่ยมโปแตสเซี่ยมฟอสเฟต และแม็กนีเซี่ยมโซเดี่ยมฟอสเฟตซึ่งไม่ค่อยละลายน้ำ การตกตะกอนอาจไม่เกิดขึ้นอย่างทันทีจนกว่าอีกหลายชั่วโมงต่อมาภายหลังจากการทำเป็นสารละลายแล้ว ด้วยเหตุนี้เกลือแม็กนีเซี่ยมจึงควรนำมาออโตเคลฟแยกจากฟอสเฟต แคลเซี่ยมซัลเฟตมีการละลายได้น้อยประมาณ 0.2% เท่านั้น ในสื่อกลางอาหารที่ปราศจากคีเลติ่ง เอเจนต์ดูเสมือนว่าธาตุเหล็กทั้งหมดถูกทำให้ตกตะกอนและไม่อาจใช้ได้จนกว่าสารละลายนั้นจะเป็นกรดแก่ขึ้น แผ่นกรองแบบ **Seitz** สามารถดูดซับเฟอร์ริกไอออนไว้ได้มาก และอาจทำให้เกิดการขาดแคลนธาตุเหล็กได้ (**Kurowski & Pirt, 1971**) ในสื่อกลางอาหารธรรมชาติปกติมีกรดอะมิโนและสารประกอบอื่นที่สามารถคีเลตธาตุปลีกย่อยต่าง ๆ ได้ สื่อกลางอาหารขั้นต่ำหลายชนิดที่แนะนำให้ใช้ในเอกสารและตำราต่าง ๆ มักมีข้อเสียเนื่องจากไม่มีคีเลติ่ง เอเจนต์เพื่อป้องกันการตกตะกอนของธาตุเหล็กและธาตุปลีกย่อยอื่น ๆ ประกอบอยู่ด้วย **Hutner** (1972) ได้เสนอการเตรียมส่วนผสมของธาตุปลีกย่อยในรูปแบบที่เป็นผงแห้ง ผงแห้งของกรดอะมิโนและวิตามินมีความสะดวกมากต่อการเตรียมสื่อกลางอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อของสัตว์ชั้นสูง

12.13 บทสรุป

การศึกษาส่วนใหญ่เกี่ยวกับโภชนาการของจุลินทรีย์มักเกี่ยวข้องกับการชันสูตรปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตต่าง ๆ และเพื่อเลือกสรรสื่อกลางอาหารที่เหมาะสมบนพื้นฐานแห่งคุณภาพ จึงเป็นเหตุทำให้มีการเติมซับสเตรตต่าง ๆ ลงไปในปริมาณไม่มากก็น้อยตามอำเภอใจ จุดมุ่งหมายสุดท้ายที่ควรได้รับจากสื่อกลางอาหารจำกัดก็คือสภาวะต่าง ๆ

ที่เหมาะสม การใช้สื่อกลางอาหารชับซ้อนซึ่งไม่จำกัดอาจปิดบังความสำคัญของผลกระทบทางโภชนาการต่าง ๆ ได้ตัวอย่างเช่นการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ซีฟาโลสปอรินโดยนอร์ลีวซีน (Drew & Demain, 1973) การปรับปรุงสื่อกลางอาหารจำกัดเพื่อให้เหมาะสมต่อขบวนการหนึ่งก็ขึ้นอยู่กับความชัดแจ้งในหน้าที่ของส่วนประกอบต่าง ๆ ทั้งหมดในสื่อกลางอาหารนั้นและการกระทำปฏิกริยาต่อกัน การศึกษาถึงผลกระทบจากการกำหนดจำกัดขอบเขตการเจริญเติบโตโดยสารอาหารต่าง ๆ ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีเป็นการพิสูจน์บทบาทอย่างชัดแจ้งและเฉพาะเจาะจงของสารอาหารแต่ละอย่างในเชื้อจุลินทรีย์ การศึกษาเช่นนี้ส่วนใหญ่มักศึกษาอยู่ในขอบเขตของการจำกัดการเจริญเติบโตด้วยแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียงไม่กี่ชนิด แอมโมเนีย โปแตสเซี่ยม แม็กนีเซี่ยม และฟอสเฟตไอออน ในขณะที่ปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตอย่างอื่นและธาตุย่อยต่าง ๆ มักถูกละทิ้งไม่ได้ทำการศึกษา อีกทั้งการศึกษาถึงชับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ก็จำกัดอยู่ในแวดวงของแบคทีเรียเพียงไม่กี่สายพันธุ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องขยายการศึกษาให้กว้างขวางออกไปถึงพวกโปรคาริโอตและยูคาริโอตอีกมากมาย.