บทที่ 13
อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมัก

13.1 ผลกระทบต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโต

อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยหนึ่งที่เซลล์ไม่อาจหลีกเลี่ยงได้เนื่องจากอุณหภูมิของเซลล์จะต้องเท่ากันกับอุณหภูมิของสื่อกลางอาหารในเวลาต่อมา แตกต่างจากค่าพีเอชและค่าความไวของน้ำ (water activity) ซึ่งภายในเซลล์อาจไม่จำเป็นต้องเท่ากันกับของสื่อกลางอาหารข้างนอก อุณหภูมิมีผลกระทบต่อปฏิกริยาของเซลล์, ธรรมชาติของการเมตาโบลิซึ่ม, ความต้องการทางโภชนาการและส่วนประกอบของชีวมวล

ผลกระทบเนื่องจากอุณหภูมิต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตได้แสดงไว้ในรูปที่ 13.1 ในช่วงของอุณหภูมิส่วนใหญ่ที่ต่ำกว่าอุณหภูมิเหมาะสม อุณหภูมิสัมประสิทธิ์ของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตจะตรงกันกับค่า Q_{10} ประมาณเท่ากับ 2 นั่นก็คืออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าต่อทุก ๆ 10° ซ ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตจะเข้าใกล้ศูนย์เมื่อมีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 10° ถึง 25° ซ ผลกระทบของอุณหภูมิต่อช่วงระยะเวลาล่าหลังในการเจริญเติบโตจะขนานกันกับผลกระทบของอุณหภูมิต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตดังจะได้กล่าวถึงต่อไปในตอนที่ 19.5

13.2 ผลกระทบต่อพลังงานในการกระตุ้นเพื่อการเจริญเติบโต

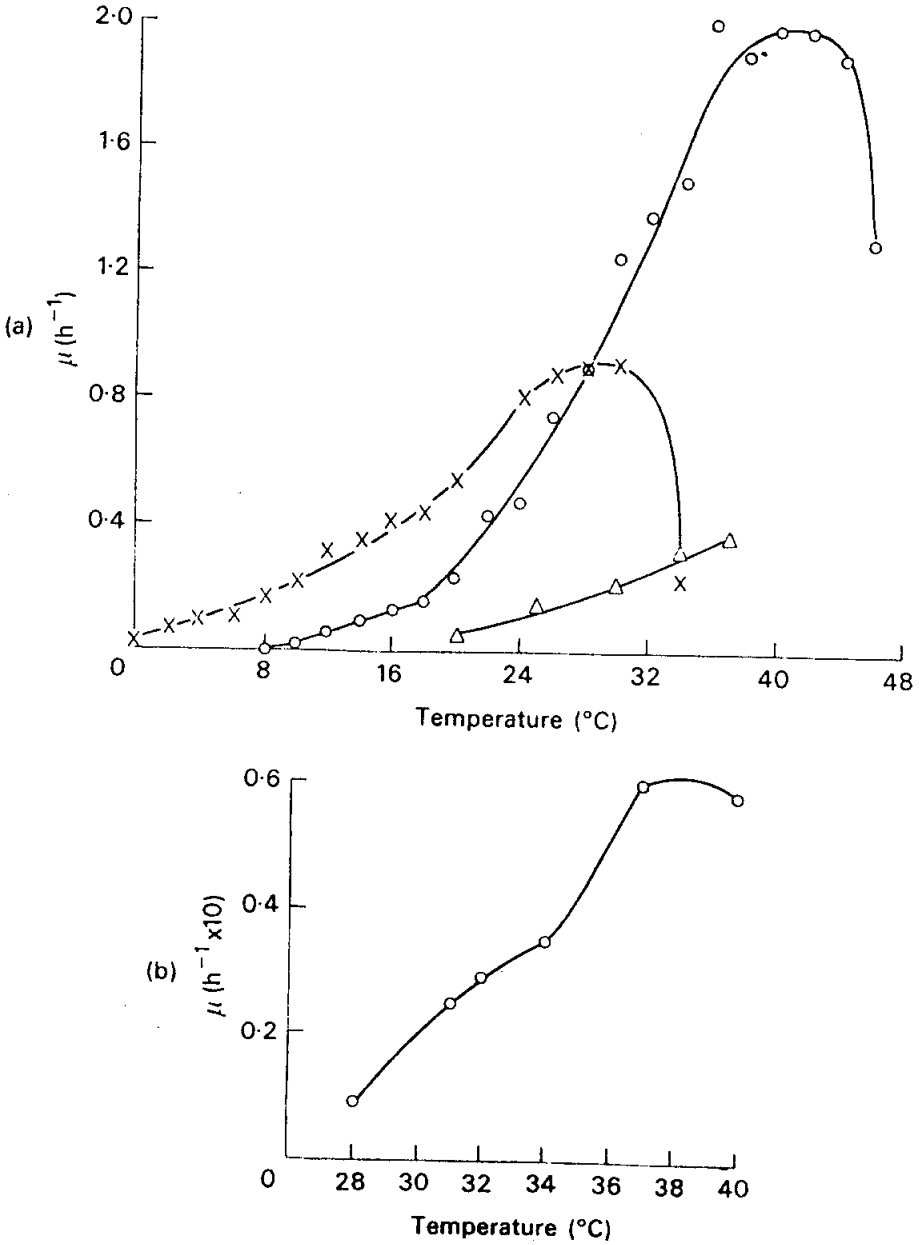
อัตราความเร็วของปฏิกริยาเคมีถูกทำให้สัมพันธ์กันกับอุณหภูมิโดยสมการของ **Arrhenius** คือ

$$K = A\,e^{-E/RT} \qquad 13.1$$

ซึ่ง K คืออัตราความเร็วของปฏิกริยา R คือค่าคงที่ของแกส T คืออุณหภูมิเป็นองศาสมบูรณ์ A คือค่าคงที่ขึ้นอยู่กับความถี่ในการเกิดสารประกอบซับซ้อนที่ถูกกระตุ้นของสารปฏิกริยาและ E คือค่าคงที่ซึ่งถือว่าเป็นพลังงานกระตุ้น (**activation energy**) หรือ

ที่เรียกกันว่าลักษณะอุณหภูมิ (temperature characteristic) จากสมการที่ 13.1 จะได้ว่า

$$\log K = \log A - E/2{\cdot}30RT \qquad 13.2$$



รูปที่ 13.1 Specific growth rates (μ) of protists and mouse leucocytes as functions of temperature. (a) O, *Escherichia coli* in rich medium (from data of Ingraham, 1958); X, psychrophilic pseudomonad 21-3c (from data of Ingraham, 1958); Δ, *Aspergillus nidulans* (from data of Trinci, 1969). (b) Mouse leucocytes (from data of Watanabe & Okada, 1967).

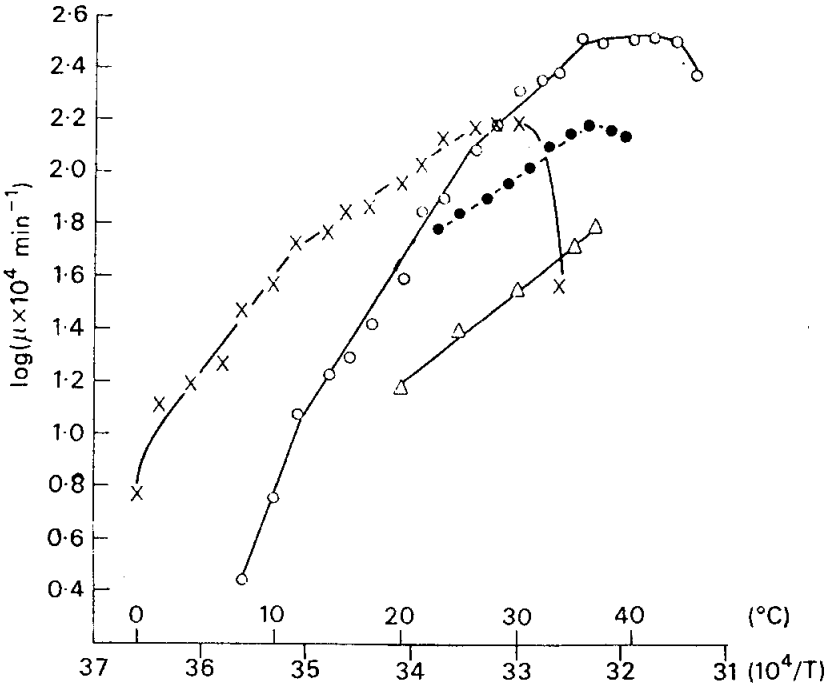
ถ้าลากเส้นกราฟของ $\log K$ ต่อ $1/T$ จะได้กราฟเส้นตรงโดยมีความลาดเอียงเท่ากับ $E/2{\cdot}30\,RT$ ถ้าแทนค่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ (μ) สำหรับอัตราความเร็วของปฏิกริยา (K) ในสมการที่ 13.2 จะได้ความสัมพันธ์เส้นตรงระหว่าง $\log \mu$ กับ $1/T$ อยู่ในขอบเขตจำกัดดังรูปที่ 13.2 ค่าสำหรับพลังงานกระตุ้นของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ให้ไว้ในตารางที่ 13.1 ตลอดค่าตัวเลขช่วงสั้นของ **Monod** สำหรับ **Escherichia coli** และของ **Trinci** สำหรับ **Aspergillus nidulans** จะได้ค่า E คงที่ ตัวเลขของ **Ingraham** สำหรับ **E.coli** ชี้ให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างทันทีทันใดของพลังงานกระตุ้นเมื่ออุณหภูมิตกลงต่ำกว่า 26° ข และสำหรับพวก **psychrophilic pseudomonad** เมื่ออุณหภูมิตกลงต่ำกว่า 12° ข ในส่วนซึ่งสูงขึ้นของช่วงอุณหภูมิค่า E สำหรับแบคทีเรียจะเป็นประมาณ 14,000 แคลอรี่และค่าจะเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าในส่วนของช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า รูปร่างของเส้นกราฟระหว่าง $\log \mu$ กับ $1/T$ สำหรับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูก็คล้ายกันกับของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามค่า E มีความคงที่เพียงแค่ช่วงอุณหภูมิจาก 37° ข ถึง 30° ข เท่านั้นแต่ที่ต่ำกว่า 30° ข ค่า E จะเพิ่มขึ้น (**Watanabe & Okada, 1967**)

เป็นที่น่าสังเกตุว่าอุณหภูมิสัมประสิทธิของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตถูกแสดงออกด้วยค่า Q_{10} ซึ่งเป็นการกระทำของช่วงอุณหภูมิ จากสมการของ **Arrhenius** จะได้ว่า

$$\log Q_{10} = \frac{E}{2{\cdot}30R}\,\frac{10}{(T+10)T} \qquad 13{\cdot}3$$

ดังนั้น Q_{10} จึงควรเปลี่ยนแปลงผกผันกันกับอุณหภูมิแต่ผลกระทบอาจเกินกว่าช่วงอุณหภูมิปกติในการเจริญเติบโต พลังงานกระตุ้นเป็นค่าคงที่ซึ่งมีคุณค่าต่อการทำนายถึงผลกระทบของอุณหภูมิต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตลอดช่วงของอุณหภูมิปกติ

การเปลี่ยนแปลงพลังงานกระตุ้นชี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในการควบคุมอัตราความเร็วปฏิกริยาหรือในการควบคุมเมตาโบลิซึ่มซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ หลักฐานในแง่นี้ได้ถูกเสนอโดย **Ng** และคณะในปี 1962 พบว่าการสกัดเอนไซม์ **β-galactosidase** ใน **E. coli** โดยน้ำตาลกลูโคสจะเริ่มไม่ได้ผลที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25° ข และไม่ปรากฏการยับยั้งเลยตลอดการเจริญเติบโตที่ 10° ข



รูปที่ 13.2 Application of Arrhenius equation to the specific growth rates of microbes. ○, *Escherichia coli* and X, psychrophilic pseudomonad in rich media (from data of Ingraham, 1958); ●, *E. coli* in minimal medium (from data of Monod, 1942); △, *Aspergillus nidulans* (from data of Trinci, 1969).

ตารางที่ 13.1 Values of the activation energy (E) for microbial growth

Organism	Temperature range (°C)	E (calories)
Aspergillus nidulans[1]	20–37	14 000
Escherichia coli[2]	23–37	13 100
Escherichia coli[3]	26–37	16 200*
Escherichia coli[3]	12–26	28 600
Psychrophilic pseudomonad[1]	12–30	12 600*
Psychrophilic pseudomonad[1]	2–12	23 800
Klebsiella aerogenes[4]	20–40	14 230
Mouse tissue cells [5]	31–38	27 500

[1]From data of Fig. 13.2; [2]from Monod data in Fig. 13.2; [3]from Ingraham data in Fig. 13.2; [4]Topiwala & Sinclair (1971); [5]Watanabe & Okada (1967)

* Re-calculated from data given by Ingraham (1958)

ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละสายพันธ์จะอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 35° ซ พวก **psychrophile** ที่แท้จริงจะสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงระหว่าง −5° ถึง 35° ซ และพวก **thermophile** ที่แท้จริงจะสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงระหว่าง 55° ถึง 90° ซ ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตของพังไจสายพันธุ์ต่าง ๆ จะอยู่ที่ประมาณ 30° ซ และสำหรับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจะประมาณ 12° ซ

13.3 ขอบเขตจำกัดสูงสุดของอุณหภูมิในการเจริญเติบโต

การลดลงของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงอาจเป็นผลเนื่องมาจากการแตกแยกในการควบคุมเมตาโบลิซึ่มหรือการตายของเซลล์ ถ้ามีการตายเกิดขึ้นอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของชีวมวลที่มีชีวิต (x) จะถูกกำหนดได้โดยสมการ

$$dx/dt = (\mu - k)x \qquad 13.4$$

ซึ่ง μ = อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะและ k = อัตราการตายเฉพาะ อัตราการตายจะเด่นชัดยิ่งขึ้นที่อุณหภูมิสูงถ้าพลังงานในการกระตุ้นให้ตายมีมากกว่ากระตุ้นให้เจริญเติบโต สิ่งนี้อาจพบได้ใน ***Klebsiella aerogenes*** ซึ่งใช้พลังงานในการกระตุ้นให้ตายเท่ากับ 32,000 แคลอรี่เทียบกับค่า 14,230 แคลอรี่สำหรับกระตุ้นให้เจริญเติบโต **(Topiwala & Sinclair, 1971)**

การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในที่สุดจะทำให้โครงสร้างของโปรตีนแตกสลายจนกระทั่งมีผลกระทบต่อสัมพรรคภาคกับซับสเตรตและการควบคุมเอนไซม์ ดังจะเห็นได้จากการที่เอนไซม์มีความอ่อนไหวต่ออุณหภูมิ แบคทีเรียที่**ชอบ**ความร้อน **(thermophilic bacter)** บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 90° ซ พบว่ามีโปรตีนซึ่งทนทานต่อความร้อนได้ดีเป็นพิเศษ **(Campbell & Pace, 1968)** แต่ที่กลับกันคือยังไม่มีหลักฐานแสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ของพวกที่ชอบความเย็น **(psychrophile)** อันเป็นเหตุทำให้ทนทานต่อความเย็นได้

13.4 ผลกระทบต่อความต้องการสารอาหารในการหมัก

การลดอุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอาจเป็นสาเหตุทำให้พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (10 ถึง 20%) ใน **Klebsiella aerogenes** การลดลงของพืลผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากน้ำตาลกลูโคสอันเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิถูกถือว่ามีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานเพื่อการทำนุบำรุงมากขึ้นที่อุณหภูมิสูง (Topiwala & Sinclair, 1971) พลังงานกระตุ้นสำหรับการเมตาโบลิซึมเพื่อการทำนุบำรุงคือ 9,000 แคลอรี่

เส้นทางการเมตาโบลิซึมของแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนมีความอ่อนไหวต่ออุณหภูมิ ตัวอย่างเช่น **Lactobacillus brevis** ที่ 24° ซ ทำให้เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยเส้นทางแบบฮีทีโรแลคติค ส่วนที่ 37° ซ กลับต้องการน้ำตาลฟลุกโตสเป็นสิ่งรองรับไฮโดรเจนเพื่อทำให้เกิดแมนนิทอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคส (De Ley, 1962)

ที่อัตราความเร็วหนึ่งของการเจริญเติบโตพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญ-เติบโตจากแมกนีเซี่ยม โปแตสเซี่ยม และฟอสเฟตอาจลดลงตามการลดลงของอุณหภูมิอันเป็นผลสะท้อนมาจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณอาร์เอนเอในเซ็มวล (Tempest, 1969)

ความต้องการปัจจัยเพื่อการเจริญเติบโตก็มีการเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ ตัวอย่างเช่น **Yersinia** (**Pasteurella**) **pestis** มีความต้องการกรดอะมิโนและวิตามินแตกต่างกันเมื่อเจริญเติบโตที่ 37° ซ กับที่ 28° ซ (Hill & Spurr, 1952) อุณหภูมิที่สูงขึ้นจาก 28° . ถึง 37° ซ ในขณะที่มีการเจริญเติบโตของ **Y. pestic** จะต้องคอยถูกทำให้สูงขึ้นทีละน้อยมิฉะนั้นจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายได้ เอนไซม์จำนวนหนึ่งที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน **Y. pestis** มีความอ่อนไหวต่ออุณหภูมิมาก **Escherichia coli** จะมีความต้องการกรดกลูตามิกและนิโคตินาไมด์เพื่อการเจริญเติบโตที่ 44° ซ (Ware, 1951) **Saccharomyces cerevisiae** ถูกพบว่ามีความต้องการกรดแพนโตเทอนิคและโบเทียม-คลอไรด์เพื่อการเจริญเติบโตที่ 38° ซ แต่จะไม่ต้องการที่ 30° ซ (Beque & Lichstein, 1963)

13.5 ผลกระทบต่อการเกิดผลผลิตจากการหมัก

การเมตาโบลิซึ่มขั้นทุติยภูมิและการผลิตสารเมตาโบไลต์สื่อกลางจนมากอย่างเหลือเฟือ อาจเป็นการตอบสนองต่ออุณหภูมิในอีกวิถีทางหนึ่งซึ่งนอกเหนือจากการเจริญ-เติบโต ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีที่จำกัดน้ำตาลกลูโคสของ **Aspergillus nidulans** ทำให้อัตราการผลิตเมลานินเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าที่อุณหภูมิระหว่าง 23° ซ และ 37° ซ เมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตถูกรักษาไว้ให้คงที่ที่ 0.05 h^{-1} (**Rowley & Pirt**, 1972) การผลิตไรโบฟลาวินอย่างมากมายโดยเชื้อ **Ashbya gossypii** ต้องการการเจริญเติบโตที่ 28° ซ ทั้ง ๆ ที่จุลินทรีย์นี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีเท่ากันที่ 37° ซ เซลล์พักตัวของ **A. gossypii** ซึ่งเคยเจริญเติบโตที่ 28° ซ มาก่อนแล้วจะผลิตไรโบฟลาวินได้อย่างมากมายทั้งที่ 28° ซ และ 37° ซ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำทำให้เสื่อมความสามารถในการควบคุมการสังเคราะห์ระบบเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไรโบฟลาวินตามปกติ (**Demain**, 1972b) ผลจากการหมักแบบเก็บกักของ **Owen & Johnson** (1955) ชี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเพ็นนิซิลลินจะต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา อย่างไรก็ตามเพื่อทำให้ผลการศึกษากระจ่างชัดยิ่งขึ้น จำเป็นต้องทำการหมักแบบคงที่ทางเคมีที่สถานะมั่นคง

13.6 ผลกระทบต่อส่วนประกอบของจุลินทรีย์

อุณหภูมิมีผลกระทบต่ออาร์เอนเอ โปรตีน และลิปิดซึ่งเป็นองค์ประกอบของแบคทีเรียและยีสต์ในวิถีทางดังต่อไปนี้ (**Hunter & Rose**, 1972) ด้วยอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตที่กำหนดให้ปริมาณอาร์เอนเอของแบคทีเรียหรือยีสต์จะเพิ่มขึ้นเป็นหลายเท่าเมื่อลดอุณหภูมิ ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของยีสต์อาจเปลี่ยนแปลงขึ้นหรือลงตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต ลิปิดของยีสต์จะเพิ่มปริมาณของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเมื่อลดอุณหภูมิ ใน **E. coli** อุณหภูมิที่สูงเกินกว่าสำหรับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุดจะทำให้มีปริมาณกรดพาลมิติกสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเนื่องจากมีการใช้กรดเฮ็กซาดีซีโนอิกและออกตาดีซีโนอิกซึ่งไม่อิ่มตัว

มากขึ้น (Marr & Ingraham, 1962) อาจเป็นไปได้ว่าโครงสร้างของลิปิดที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ถูกดัดแปลงอย่างต่อเนื่องตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเพื่อรักษาการทำงานของลิปิดเอาไว้ การทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์โดยอุณหภูมิอาจมีผลทำให้สูญเสียเมตาโบไลต์ต่าง ๆ และกระตุ้นให้เกิดการผลิตซึ่งมากเกิน

องค์ประกอบที่เป็นแอนติเจนของแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพตามอุณหภูมิ ตัวอย่างเช่น แอนติเจนของ Y. pestis ซึ่งจำเป็นต่อความสามารถในการทำให้เกิดโรคถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ในระหว่างการเจริญเติบโตที่ 37° ซ แต่จะไม่สังเคราะห์ที่ 28° ซ (Pirt et al., 1961) จากการสังเกตุดังกล่าวจึงแสดงว่าพื้นผิวโครงสร้างของแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิในการเจริญเติบโต

13.7 กลไกเกี่ยวกับผลกระทบของอุณหภูมิ

ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของชีวมวลได้ถูกอธิบายไว้เป็นพื้นฐานในแง่ของโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับอุณหภูมิโดยเฉพาะโปรตีนและลิปิด และในแง่ของอุณหภูมิสัมประสิทธิของอัตราความเร็วปฏิกริยาซึ่งขึ้นอยู่กับพลังงานกระตุ้นของปฏิกริยา การตอบสนองต่อสิ่งกระทบเบื้องต้นนี้บางทีอาจมีผลกระทบถึงขั้นที่สองของกลไกในการควบคุมเมตาโบลิซึม เช่น ความเฉพาะเจาะจงต่อปฏิกริยาของเอนไซม์ ความสามารถในการซึมซับของเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์ ผลกระทบในขั้นที่สองนี้อาจถูกขัดขวางได้ขนาดหนึ่งโดยสภาพแวดล้อมพิเศษ.