บทที่ 14
ผลกระทบเนื่องจากพีเอช (pH) ต่อการหมัก

14.1 พีเอชนอกเซลล์และภายในเซลล์

อิทธิพลของไฮโดรเจนไอออนต่อกิจกรรมทางชีววิทยามีความสัมพันธ์กันกับค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน $[H^+]$ หรือค่าความไวไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion activity, a_h) อย่างใดอย่างหนึ่ง ค่าตัวแปรทั้งสองนี้มีสัดส่วนต่อกันคือ $a_h = f[H^+]$ ซึ่ง f คือค่าสัมประสิทธิความไวที่อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามความแข็งไอออน (ionic strength) และปัจจัยอื่น ๆ หลอดแก้วอีเล็คโตรดตอบสนองต่อค่าความไวไฮโดรเจน-ไอออนอย่างเข้มงวดคือ $pH = -\log(a_h)$ และ $[H^+]$ สามารถใช้ทดแทน a_h ได้เฉพาะเมื่อสัมประสิทธิความไวมีค่าเท่ากับหนึ่ง ในสื่อกลางที่เจือจาง $f \approx 1$ แต่จะห่างไกลจากความเป็นจริงมากเมื่อสื่อกลางเป็นสารละลายเกลือแก่ นานเท่านานที่คุณสมบัติของเซลล์มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับค่าความไวของไฮโดรเจนไอออน ดังนั้นค่าความไวไฮโดรเจน-ไอออนจึงเป็นค่าตัวแปรที่มีความหมายมากยิ่งจนกระทั่งเหมาะที่จะใช้ค่านี้แสดงผลของไฮโดรเจนไอออนในรูปของพีเอช

เยื่อพลาสม่าที่ห่อหุ้มเซลล์ไม่ยอมให้ไฮโดรเจนหรือไฮดรอกซิลไอออนซึมผ่านไปได้โดยอิสระ ดังนั้นความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์และนอกเซลล์จึงไม่จำเป็นต้องเท่ากัน ความแตกต่างในความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนระหว่างผิวของเยื่อหุ้มจึงเป็นที่คาดหวังได้ว่ามีอยู่เสมอ ตามทฤษฎีเคมีเกี่ยวกับออสโมซิส (chemiosmotic theory) ความแตกต่างในความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนร่วมกับศักย์ภาพทางไฟฟ้าของเยื่อกั้นเป็นสิ่งแสดงถึงแรงขับดันของโปรตอนที่ทำให้เกิดปฏิกริยาต่าง ๆ ของเยื่อหุ้ม (Mitchell, 1973)

14.2 การควบคุมพีเอชในเชื้อจุลินทรีย์

ในการศึกษาถึงเชื้อจุลินทรีย์มักมีปัญหาเกี่ยวกับการควบคุมพีเอชและมักไม่อาจทำให้พีเอชเป็นปัจจัยซึ่งคงที่ได้ เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงพีเอชอย่างสำคัญยิ่งจึงจำเป็นต้องรู้จักเกี่ยวกับกลวิธีการควบคุมพีเอช พีเอชของเชื้อจุลินทรีย์อาจถูกควบคุมได้โดยใช้พีเอชบัฟเฟอร์หรือโดยการทำให้สมดุลย์กันระหว่างการผลิตและการใช้กรดของเชื้อจุลินทรีย์หรือโดยการเติมกรดหรือด่างอย่างอัตโนมัติลงไปในเชื้อจุลินทรีย์

การใช้พีเอชบัฟเฟอร์มีข้อจำกัดทั้งในช่วงของพีเอชและความสามารถในการรับและปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออนออกมา อีกทั้งพีเอชบัฟเฟอร์ยังอาจมีผลกระทบต่อสรีรวิทยาเฉพาะบางอย่างของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ถูกใช้อย่างแพร่หลายสำหรับช่วงพีเอช 6 ถึง 8 สำหรับค่าพีเอชน้อยกว่า 6 มักใช้พทาเลท (phthalate) และสำหรับค่าพีเอชมากกว่า 8 มักใช้โบเรท (borate) เพื่อรักษาไว้ซึ่งความจุบัฟเฟอร์ (buffer capacity) การผลิตกรดและเบสของเชื้อจุลินทรีย์ควรถูกจำกัดโดยการออกแบบสื่อกลางอาหารให้เหมาะสม การใช้แคลเซี่ยมคาร์โบเนตจำนวนมากอย่างเหลือเฟือเป็นวิถีทางหนึ่งซึ่งมีประสิทธิภาพมากในการทำให้กรดที่ผลิตออกมาเป็นจำนวนมากเป็นกลางได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่ค่อยสดวกนักเนื่องจากแคลเซี่ยมคาร์โบเนตมักตกตะกอน

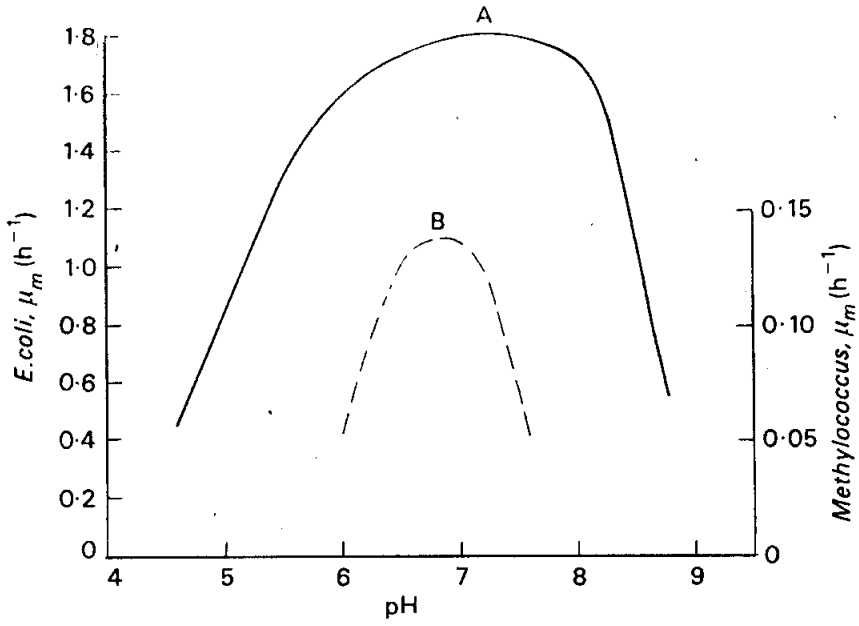
อาจมีทางเป็นไปได้ในการทำให้การผลิตกรดสมดุลย์กันกับการใช้แอนไอออนที่เป็นกรดของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น การใช้อะซีเตทหรือไนเตรตไอออนแล้วถูกแทนที่ด้วยไฮดรอกซิลไอออน การผลิตเบสอาจถูกทำให้สมดุลย์กันกับการใช้แคทไอออนของเชื้อจุลินทรีย์ในสื่อกลางอาหาร เช่นใช้แอมโมเนียไอออนแล้วแทนที่ด้วยไฮโดรเจนไอออน ในกรณีที่การใช้แอมโมเนียไอออนเป็นสาเหตุเดียวซึ่งทำให้เกิดกรด การเกิดกรดโดยกรณีนี้อาจหลีกเลี่ยงได้โดยการใช้ยูเรียหรือไกลซีนแทนแอมโมเนีย

ข้อจำกัดของวิธีการควบคุมพีเอชดังกล่าวข้างต้นอาจถูกแก้ไขได้โดยใช้วิธีการเติมกรดหรือเบสลงไปอย่างอัตโนมัติซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการวัดพีเอชด้วยหลอดแก้วอีเล็คโตรด โดยปกติกรดที่ใช้เติมลงไปคือกรดไฮโดรคลอริกหรือซัลฟูริกอย่างใดอย่างหนึ่ง และสำหรับเบสคือ โซเดียม โปแตสเซี่ยม หรือแอมโมเนี่ยมไฮดรอกไซด์อย่างใดอย่างหนึ่ง

แกสแอมโมเนียมักนิยมใช้กันมากกว่าแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เนื่องจากแอมโมเนียม-ไฮดรอกไซด์แม้แต่ที่เข้มข้นสูงมาก(0.880)ก็ยังมีการปะปนด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย เพื่อศึกษาถึงผลกระทบเนื่องจากพีเอชต่อการเจริญเติบโตบนแผ่นวุ้นอาหาร พีเอชซึ่งค่อยแตกต่างกันเป็นลำดับอาจถูกทำให้เกิดขึ้นได้บนผิววุ้นจากฟากหนึ่งไปยังอีกฟากหนึ่งของจานเลี้ยงเชื้อโดยเทวุ้นอาหารซึ่งมีพีเอชหนึ่งให้ลาดเอียงไปข้างหนึ่งแล้วปิดทับด้วยวุ้นอาหารที่มีพีเอชต่างกันอีกชั้นหนึ่ง (**Sacks & Pence, 1958**)

14.3 ผลกระทบเนื่องจากพีเอชต่อการเจริญเติบโตและเมตาโบลิซึม

ผลกระทบเนื่องจากพีเอชต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้แสดงไว้ในรูปที่ 14.1 จะเห็นได้ว่าเส้นกราฟมีสัดส่วนสมมาตรกันดีต่างจากเส้นกราฟที่ได้จากผลกระทบเนื่องจากอุณหภูมิดังรูปที่ 13.1 อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุดถูกรักษาไว้ได้ตลอดช่วง 1 ถึง 2 หน่วยพีเอชและช่วงทั้งหมดของพีเอชที่แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้คือ 2 ถึง 5 หน่วยพีเอช



รูปที่ 14.1 Effects of medium pH value on maximum bacterial growth rates: A, *Escherichia coli* in anaerobic casein hydrolysate medium with buffer control of pH (from data of Gale & Epps, 1942); B, *Methylococcus capsulatus* grown on methane with pH control by automatic addition of acid or base (Harwood, 1970).

พีเอชของเชื้อจุลินทรีย์ถูกพิจารณาว่ามีอิทธิพลต่อการเกิดผลผลิตสุดท้ายสำหรับแอนแอโรบิคเมตาโบลิซึ่มของแหล่งพลังงานและคาร์บอน **Klebsiella aerogenes** ที่พีเอช 5 ภายใต้สภาพแอนแอโรบิคหรือถูกจำกัดออกซิเจนจะผลิต 2, 3 บูทานีดิอลเป็นผลผลิตส่วนใหญ่จากการหมักน้ำตาล แต่ที่พีเอช 7 บูทานีดิอลส่วนใหญ่จะถูกทดแทนด้วยแลคเตท ในกรณีของแอนแอโรบิคเมตาโบลิซึ่มของแบคทีเรียหลายชนิดที่พีเอชค่อนข้างเป็นกรดมักทำให้เกิดผลผลิตที่เป็นกลาง แต่ที่พีเอชเป็นด่างมักผลิตกรดอินทรีย์ อย่างไรก็ตามกฎนี้ก็มีข้อยกเว้นอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะพวกแลคโตบาซิลไลและสเตรพโตคอคไซซึ่งที่พีเอชเป็นกรดก็ยังคงหมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติคได้ และ**Acetobater** ก็ยังคงออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดที่ค่าพีเอชเป็นกรด แต่ธรรมชาติของผลผลิตสุดท้ายจากการหมักน้ำตาลโดยสเตรพโตคอคไซและแบคโตบาซิลไลก็ยังขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ที่พีเอชเป็นกรดผลผลิตเกือบทั้งหมดที่ได้ก็คือกรดแลคติคแต่ที่พีเอชสูงขึ้นจะได้กรดอะซีติกและฟอร์มิก (de Ley, 1062) ดังนั้นที่พีเอชสูงจึงเหมาะในการผลิตกรดด้วยสัดส่วนต่อโมลของซับสเตรตมากขึ้น การหมักน้ำตาลของยีสต์ทำให้เกิดอีทานอลที่พีเอชเป็นกรดแต่ที่พีเอชเป็นด่างก็ทำให้เกิดกรีเซอรอลและกรดอะซีติก มีหลักฐานเชื่อได้ว่าพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงก็ได้รับผลกระทบจากค่าพีเอชเช่นกัน (ตอนที่ 8.3.3)

Gale & Epps (1942)ได้สังเกตุการหมักแบบเก็บกักของ **Escherichia coli** ในเคชีนไฮโดรไลเสตพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คีคาร์บอซายเลสของกรดอะมิโนอยู่ทางด้านที่เป็นกรด (pH 5) ส่วนพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คีแอ-มีเนสอยู่ทางด้านที่เป็นด่าง (pH 8) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงเมตาโบลิซึ่มจึงมักเป็นไปในแง่เพื่อควบคุมพีเอชของสื่อกลางให้เข้าใกล้กับความเป็นกลาง ผลกระทบเช่นนี้อาจถูกทำให้ซับซ้อนยิ่งขึ้นโดยการเปลี่ยนแปลงอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตและร่วมด้วยกับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ความยุ่งยากเช่นนี้ปัจจุบันอาจหลีกเลี่ยงได้โดยการหมักแบบคงที่ทางเคมีเพื่อควบคุมอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามจากการสังเกตุของ Gale & Epps (1942)เสนอว่าปริมาณเอนไซม์ถูกควบคุมเพื่อรักษาไว้ซึ่งความคงที่ในกิจกรรมและชดเชยสำหรับผลกระทบที่ได้รับจากค่าพีเอชของสื่อกลาง

เนื่องจากพีเอชของสื่อกลางมีผลกระทบต่อการแตกตัวของสารประกอบที่เป็นกรดหรือด่างจึงมีอิทธิพลในการยับยั้งหรือต่อต้านความเป็นพิษของสารประกอบนั้นได้ ตัวอย่างเช่น ความเป็นพิษของกรดอ่อนได้แก่กรดอะซีติลต่อเชื้อจุลินทรีย์มักขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของสื่อกลาง เนื่องจากกรดอิสระสามารถละลายในลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีกว่ากรดที่อยู่ในรูปซึ่งถูกไอโอไนส์เป็นไอออน ดังนั้นการลดค่าพีเอชของสื่อกลางจึงเหมาะสำหรับทำให้กรดถูกนำไปภายในเซลล์

การเมตาโบลิซึ่มขั้นทุติยภูมิซึ่งขึ้นอยู่กับค่าพีเอชอาจแตกต่างจากการเจริญเติบโตและการเมตาโบลิซึ่มขั้นพื้นฐาน สิ่งนี้ได้ถูกแสดงโดย **Aspergillus nidulans** ซึ่งมีอัตราความเร็วเฉพาะในการผลิตเมลานินเกือบคงที่ที่ค่าพีเอชจาก 3 ถึง 7 แต่จะเพิ่มขึ้นถึงยี่สิบเท่าระหว่างค่าพีเอช 7 และ 7.9 (**Rowley & Pirt, 1972**)

14.4 ผลกระทบเนื่องจากพีเอชต่อส่วนประกอบและสัณฐานวิทยาของชีวมวล

ส่วนประกอบแอนติเจนของ **Yersinia pestis** อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามค่าพีเอช เช่น แอนติเจน 4 ถูกผลิตขึ้นได้เฉพาะที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 6.9 เท่านั้นโดยมีพีเอชเหมาะสมที่ 5.9 (**Pirt et al., 1961**) ค่าพีเอชของเชื้อ **Bacillus** สปีชี่ต่าง ๆ มีผลกระทบต่อส่วนประกอบของผนังเซลล์ ด้วยการเจริญเติบโตที่จำกัดฟอสเฟตพบว่ากรดเทอิคูโรนิกถูกผลิตขึ้นได้ที่ค่าพีเอชเป็นด่าง แต่ส่วนใหญ่จะถูกแทนที่ด้วยกรดเทอิโคอิกที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 6 เมื่อการเจริญเติบโตถูกจำกัดโดยแมกนีเซี่ยม ซัลเฟต หรือแอมโมเนี่ยมไอออนอย่างใดอย่างหนึ่งกรดเทอิคูโรนิกจะไม่ปรากฏแต่กรดเทอิโคอิกจะถูกผลิตขึ้นด้วยการเพิ่มจำนวนของหมู่อลานีนซึ่งเชื่อมต่อกันเป็นโพลีเมอร์ในขณะที่พีเอชลดลงเข้าใกล้ 5.0 (**Ellwood & Tempest, 1972**)

สัณฐานวิทยาเกี่ยวกับไฮฟ่าของเชื้อรา **Penicillum chrysogenum** ซึ่งเป็นเส้นสายเมื่อเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่ถูกปั่นกวนก็ขึ้นอยู่กับพีเอช (**Pirt & Callow, 1959**) ที่พีเอช 6 จะเกิดเป็นไฮฟ่ายาวและผอมบาง แต่เมื่อเพิ่มค่าพีเอชให้สูงขึ้นถึง 7 ไฮฟ่าจะสั้นหนาและมีแวคูโอล ผลกระทบเช่นนี้แสดงว่าส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อราเปลี่ยนแปลง

ตามค่าพีเอชและที่พีเอชสูงขึ้นผนังเซลล์จะอ่อนแอลงและอาจถูกทำให้แตกได้ง่าย

โดยทั่วไปค่าพีเอชในระหว่างการเจริญเติบโตถือว่ามีผลกระทบต่อธรรมชาติของผิวเซลล์หรือสารประกอบเยื่อหุ้มต่าง ๆ

14.5 พื้นฐานระดับโมเลกุลเกี่ยวกับผลกระทบเนื่องจากพีเอช

ค่าพีเอชในเชื้อจุลินทรีย์มีผลกระทบต่อส่วนประกอบของสื่อกลางอาหารและธรรมชาติของผิวจุลินทรีย์เนื่องจากการแตกตัวของกรดและเบส ผลกระทบต่อผิวเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางผิวของชีวมวล เช่น การเกาะติดกับแก้วหรือโลหะและการจับรวมตัวกันของชีวมวล ระดับการดีเลชั่นของโลหะไอออนก็ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช

เยื่อพลาสม่าที่ห่อหุ้มเซลล์อาจทำให้ภายในเซลล์เป็นอิสระจากค่าพีเอชของสื่อกลางอาหารได้ในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามเป็นที่แน่ชัดแล้วว่าการเมตาโบลิซึ่มได้รับอิทธิพลอย่างง่ายดายจากค่าพีเอชของสิ่งแวดล้อม ความสมดุลย์กันของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์และภายนอกเซลล์อาจถูกทำให้เกิดขึ้นได้โดยเติมกรดอ่อนซึ่งละลายได้ในลิปิด เช่น ไดไนโตรฟีนอลที่ปรากฏอยู่ในสื่อกลางอาหารสามารถทำหน้าที่เป็นตัวนำโปรตอนข้ามผ่านเยื่อหุ้มพลาสม่าได้ (Mitchell, 1973) ผลเช่นนี้อาจถือได้ว่าเป็นคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของกรดที่ละลายได้ในลิปิดสำหรับแบคทีเรียบางชนิด (Freese et al., 1973) ค่าพีเอชอาจมีผลกระทบต่อความสมดุลย์ตามกันของสารประกอบโมเลกุลใหญ่เช่นในกรณีของเอนไซม์จะมีผลกระทบต่อค่า K_m (Dixon, 1953)

ผลกระทบเนื่องจากพีเอชได้กลายเป็นที่ประจักษ์แจ้งเป็นอย่างมาก จากการใช้เครื่องมืออัตโนมัติควบคุมพีเอชและการหมักแบบคงที่ทางเคมีแต่คุณสมบัติของเซลล์ก็ยังอาจเปลี่ยนแปลงได้อย่างลึกซึ้งในช่วงแคบ ๆ ของพีเอชได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามพื้นฐานระดับโมเลกุลเกี่ยวกับผลกระทบเนื่องจากพีเอชก็ยังเป็นที่เข้าใจกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น.