บทที่ 16
การเกิดผลผลิตจากการหมัก

16.1 คำนำ

การปรับปรุงขบวนการเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ในการทำให้เกิดผลผลิตเช่น สารปฏิชีวนะ กรดอะมิโน หรือโปรตีน มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้มากที่สุดสามประการคือ พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิตตอกรัมของซับสเตรต ความเข้มข้นของผลผลิต และอัตราความเร็วในการเกิดผลผลิต ลักษณะใหญ่ในการปรับปรุงเกี่ยวกับขบวนการได้ถูกกำหนดไว้ในตารางที่ 16.1 ไม่ใช่ปัจจัยทั้งหมดที่ชี้แสดงในตารางที่ 16.1 จะมีความสำคัญในทุกกระบวนการ อย่างไรก็ตามด้วยขบวนการสมัยใหม่ไม่มีปัจจัยใดที่ควรขาดการเอาใจใส่โดยสิ้นเชิง ลักษณะของขบวนการปรับปรุงทั้งหมดสี่ประการที่ได้ให้ไว้ในตารางที่ 16.1 เป็นพื้นฐานเกี่ยวข้องกับการแก้ไขให้เหมาะสมในการควบคุมเมตาโบลิซึ่มของจุลินทรีย์

ตารางที่ 16.1 Features of fermentation process development

I	Initial selection of strain of organism
II	Determination of optimum values of temperature, pH value, tonicity and oxygen supply
III	Determination of optimum nutritional regimen and biomass concentration
IV	Modification of genetic structure of the organism to increase the product formation

โดยปกติเมตาโบลิซึ่มจะถูกควบคุมเพื่อทำให้มีการผลิตเมตาโบไลท์ที่จำเป็นในปริมาณเพียงแค่พอแก่ความต้องการและอาจร่วมด้วยกับการผลิตในปริมาณเพียงเล็กน้อยของเมตาโบไลท์ทุติยภูมิซึ่งไม่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต สิ่งนี้โดยปกติในทางปฏิบัติหมายถึงว่าแหล่งธาตุคาร์บอนทั้งหมดถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นชีวมวลและผลผลิตสุดท้ายของการเมตาโบลิซึ่มเพื่อให้ได้รับพลังงาน การปรับปรุงอย่างประสพผลสำเร็จในการทำให้เกิดผลผลิตที่ต้องการสืบเนื่องมาจากการควบคุมเมตาโบลิซึ่มจนกระทั่งทำให้จุลินทรีย์มีการผลิตซึ่งมากเกิน วิธีการที่ใช้ในการรบกวนเพื่อควบคุมเมตาโบลิซึ่มของขบวนการหมักได้ถูกสรุปรวบรวมไว้โดย **Domain**

(1972a) เป็นที่น่าเสียดายว่าความรู้เกี่ยวกับเส้นทางของชีวสังเคราะห์ในการทำให้เกิดผลผลิตต่าง ๆ มักไม่เพียงพอแก่การที่จะปรับปรุงกลไกการควบคุมที่จุดซึ่งต้องการได้อย่างจงใจ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหันเหมาใช้วิธีการคัดเลือกอย่างสะเปะสะปะจากจุลินทรีย์ที่ผ่าน-เหล่าไปและด้วยสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงการผลิต ขอบเขตส่วนใหญ่ในการเปลี่ยนแปลงอย่างจงใจเพื่อควบคุมเมตาโบลิซึ่มมักถูกพบในการผลิตกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ ความเป็นไปได้ในการยับยั้งการสังเคราะห์ผลผลิตด้วยสิ่งที่เป็นผลผลิตเองได้ถูกกล่าวถึงโดย **Demain (1972b,p. 351)**และมีหลักฐานเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับการผลิตเมตาโบไลต์ทุติยภูมิแต่จากการศึกษาถึงการยับยั้งการหมักเพ็นนิซิลลินด้วยเพ็นนิซิลลินเองที่ความเข้มข้นสูงจึงได้พบตัวอย่างที่น่าสนใจ **(Gordee & Day, 1972)**

ผลผลิตจากการหมักถูกจัดแบ่งไว้เป็นหมวดหมู่ดังในตารางที่ 16.2 ซึ่งตั้งอยู่บนพื้นฐานความสัมพันธ์โดยโครงสร้างทางเคมีของผลผลิตและการทำงานของจุลินทรีย์ขบวนการสำหรับการผลิตแต่ละหมวดหมู่ของผลผลิตมีหลักในการควบคุมบางอย่างร่วมกัน ตัวอย่างเช่นสารประกอบที่ใช้เป็นสารเก็บพลังงานปกติมักถูกผลิตขึ้นเฉพาะเมื่อแหล่งพลังงานไม่ใช่เป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต **(Wilkinson & Munro, 1967)** ผลผลิตต่าง ๆ อาจถูกขับออกมาอยู่ในสื่อกลางการหมักหรือถูกเก็บกักเอาไว้ภายในเซลล์ ผลผลิตที่ถูกขับออกมานอกเซลล์อาจละลายหรือไม่ละลายในสื่อกลางการหมักก็ได้และการผลิตซึ่งมากเกินอาจนำไปสู่การตกตะกอนของผลผลิตตัวอย่างเช่นการผลิตออกซีเตตร้าไซคลินเป็นต้น

คำว่าเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ **(Secondary metabolite)** หมายถึงเมตาโบไลต์ที่มีความจำเป็นน้อยหรือไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต ตัวอย่างเช่นสารปฏิชีวนะและยิบเบอรีลลิน เป็นต้น เนื่องจากการเมตาโบลิซึ่มในขั้นทุติยภูมิไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตสายพันธุ์ที่ไม่มีการผลิตเมตาโบไลต์ทุติยภูมิจึงอาจมีชีวิตรอดได้แม้ในขณะที่มีการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลายาวนาน

เป็นที่น่าสังเกตุว่ายังไม่มีการผลิตผลผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ในเชิงการค้าโดยวิธีการหมักแบบคงที่ทางเคมี ยกเว้นโปรตีนเพื่อเป็นอาหารและเบียร์เท่านั้น สิ่งนี้เป็นผลสะท้อนมาจากการทดลองเบื้องต้นซึ่งมักนิยมใช้ขบวนการหมักแบบเก็บกักและขาดความรู้เกี่ยวกับการควบคุมสภาวะที่สำคัญต่าง ๆ

ตารางที่ 16.2 Classification of fermentation products

	Class	Examples
I	End products of energy metabolism	Ethanol, methane
II	Energy storage compounds	Glycogen
III	Enzymes	
	extracellular	Amylases
	intracellular	β-Galactosidase
IV	Structural components of cells	Single cell protein, antigens
V	Intermediary metabolites	Vitamin B_{12}, amino acids, citric acid
VI	Secondary metabolites	Antibiotics
VII	Transformed substrates	Steroids
VIII	Viruses	Poliomyelitis

16.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต กับอัตราความเร็วในการเกิดผลผลิต

16.2.1 ผลผลิตที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (Growth-linked Product)

โดยทั่วไปอัตราความเร็วในการเกิดผลผลิตถูกกำหนดได้โดย

$$dp/dt = q_p x \qquad 16.1$$

ซึ่ง p = ความเข้มข้นของผลผลิต , x = ความเข้มข้นของชีวมวล และ q_p คืออัตราความเร็วเฉพาะในการเกิดผลผลิต เมื่อผลผลิตมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตหรือเกิดขึ้นร่วมกันกับการเจริญเติบโต ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อชีวมวลที่เกิดขึ้น ดังนั้น

$$dp = Y_{p/x}\, dx \qquad 16.2$$

ซึ่ง $Y_{p/x}$ คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิตที่อ้างอิงถึงปริมาณชีวมวลที่เกิดขึ้นจึงเป็นไปได้ว่า

$$dp/dt = Y_{p/x}\, dx/dt = Y_{p/x}\mu x \qquad 16.3$$

ถ้าแสดงพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิตในรูปของซับสเตรตที่ถูกใช้ไปจะได้ว่า

$$dp = Y_{p/s}\, ds \qquad 16.4$$

ซึ่ง $Y_{p/s}$ คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิตที่อ้างอิงถึงปริมาณซับสเตรตที่ถูกใช้ไปดังนั้นจะได้ว่า

$$dp/dt = Y_{p/s}\, ds/dt = Y_{p/s}\mu x/Y_{x/s} \qquad 16.5$$

ซึ่ง $Y_{x/s}$ คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของชีวมวลที่อ้างอิงถึงซับสเตรตที่ถูกใช้ไป เมื่อเปรียบเทียบสมการที่ 16.5 จะได้ว่า

$$Y_{p/s}/Y_{x/s} = Y_{p/x} \qquad 16.6$$

อัตราความเร็วเฉพาะในการเกิดผลผลิตจะเป็นไปตามสมการที่ 16.1 และ 16.3 คือ

$$q_p = Y_{p/x}\mu \qquad 16.7$$

ขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตโดยทั่วไปมักเป็นขบวนการที่มีความจำเป็นต่อการทำงานของจุลินทรีย์ ในที่นี้รวมทั้งการผลิตองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ด้วย เช่น ผนังเซลและเอนไซม์ต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิต $Y_{p/x}$ อาจเป็นสัดส่วนโดยตรงต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ ตัวอย่างเช่น การผลิตอาร์เอนเอ แต่มีตัวอย่างที่ผิดปกติอย่างหนึ่งคือการผลิตเอนไซม์ **glucoside 3-dehydrogenase** ของ **Agrobacterium tumefaciens** ซึ่งเปลี่ยนแปลงซูโครสไปเป็น **3-ketosucrose(Kurowski, 1974)** ในกรณีนี้ $Y_{p/x}=k\mu$ ซึ่ง k คือค่าคงที่ ดังนั้น

$$q_p = Y_{p/x}\mu = k\mu^2 \qquad 16.8$$

16.2.2 ผลผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (Non-growth-linked product)

การเกิดผลผลิตที่ไม่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตอาจเป็นไปได้อย่างใดอย่างหนึ่งในสองแบบคือ ค่า q_p เป็นอิสระจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต หรือมีการเปลี่ยนแปลงตามอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะในวิถีทางซึ่งซับซ้อน ตัวอย่างในกรณีแรกคือการผลิตเพ็นนิซิลลินโดย **Penicillium** ซึ่งเป็นอิสระจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะที่ค่าสูงกว่าประมาณ 0.015 h^{-1} แต่สำหรับอัตราความเร็วใน

การเจริญเติบโตเฉพาะที่ค่าต่ำกว่าจะมีการเสื่อมสลายของกิจกรรมทางชีวสังเคราะห์เกิดขึ้น (Pirt & Righelato, 1967)

ค่า q_p ของผลผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตอาจมีความสัมพันธ์ซับซ้อนกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะได้ ตัวอย่างเช่นการผลิตเมลานินโดย **Aspergillus niger** (Rowley & Pirt, 1972) ซึ่งถูกแสดงโดยสมการ

$$q_p = q_p^{max} - k\mu \qquad 16.9$$

ซึ่ง q_p^{max} และ k คงที่ การเกิดไซโคลเด็กซ์ตรินจากแป้งโดย **Bacillus macerans** (Lane Pirt, 1973) และการผลิตสปอร์โดย **Bacillus subtilis** (Dawes & Thornley, 1970) ก็ทำนองเดียวกัน

เมื่อการเกิดผลผลิตมีส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตแต่อีกส่วนหนึ่งเป็นอิสระจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตจะได้สมการคือ

$$q_p = Y_{p/x}\mu + \beta \qquad 16.10$$

การเกิดผลผลิตสุดท้ายของเมตาโบลิซึ่มพลังงานจะเป็นไปตามความสัมพันธ์นี้ซึ่ง β ประกอบด้วยผลผลิตที่เกิดจากความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงหรือไม่คู่ควบกับการเกิดเอทีพีอย่างใดอย่างหนึ่ง การเกิดกรดแลคติกจากน้ำตาลโดย **Lactobacillus** สปีชี่ต่าง ๆ จะเป็นไปตามแบบจำลองนี้ (Luedeking & Pirt, 1959)

16.3 อัตราความเร็วในการสลายตัวของผลผลิต

อัตราความเร็วในการสะสมผลผลิตจะได้รับอิทธิพลจากอัตราความเร็วในการสลายตัวของผลผลิต โดยทั่วไปอัตราความเร็วในการสะสมผลผลิตจากการหมักแบบเก็บกักอาจเขียนเป็นสมการได้คือ

$$dp/dt = Y_{p/x}\mu x + \beta x - Z \qquad 16.11$$

ซึ่งสองพจน์แรกทางด้านขวามือของสมการที่ 16.11 หมายถึงการเกิดผลผลิตที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตตามลำดับ และ Z คืออัตราความเร็วในการสลายตัวของผลผลิต ฟังก์ชั่น Z อาจเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของชีวมวลถ้าการสลายตัว

เกิดขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ การสลายตัวของสารประกอบเก็บพลังงานอาจเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อแหล่งพลังงานถูกใช้หมดไปตัวอย่างเช่นไกลโคเจนในยีสต์ เพ็นนิซิลลินมีการสลายตัวได้เองอย่างเห็นได้ชัดและยังมีหลักฐานการสลายตัวของเพ็นนิซิลลินโดยเอนไซม์ในระหว่างการหมักอีกด้วย (**Gorde & Day, 1972**)

16.4 การเกิดผลผลิตจากการหมักแบบเก็บกัก

16.4.1 ในขณะเจริญเติบโต

การเกิดผลผลิตในขณะเจริญเติบโตของการหมักแบบเก็บกักด้วยช่วงระยะเวลาอันสั้น dt อาจกำหนดได้ว่า

$$dp = q_p x\, dt \qquad 16.12$$

ซึ่ง x คือความเข้มข้นของชีวมวล (ดูรูปที่ 16.1) ถ้าค่า q_p คงที่ความเข้มข้นของผลผลิตภายหลังจากเวลา t จะถูกกำหนดได้โดย

$$\int_{p_0}^{p} dp = q_p \int_0^{t_1} x\, dt \qquad 16.13$$

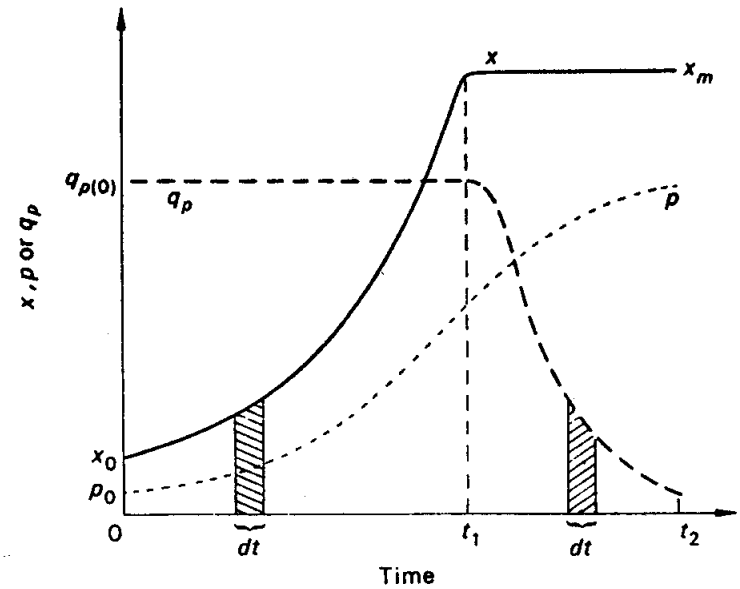
นั่นคือ

$$p = p_0 + q_p \int_0^{t_1} x\, dt \qquad 16.14$$

ค่าอินทีเกรตในสมการที่ 16.14 อาจถูกประเมินได้จากพื้นที่ภายใต้เส้นกราฟ x, t ในทางกลับกันอาจอินทีเกรตเพื่อแสดงออกสำหรับ x ถ้าการเจริญเติบโตเป็นแบบขยายในสมการที่ 16.14 จึงอาจเขียนได้ว่า $x = x_0 e^{\mu t}$ ดังนั้น

$$p = p_0 + q_p x_0 (e^{\mu t_1} - 1)/\mu \qquad 16.15$$

การเพิ่มขึ้นของชีวมวลอาจถูกทำให้เป็นเส้นตรงได้ถ้าซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตถูกป้อนเข้าไปด้วยอัตราความเร็วคงที่โดยใช้แคปซูลเพื่อการแพร่กระจาย (ตอนที่ 21.6)



รูปที่ 16.1 Product accumulation in a batch culture as a function of time. *Symbols:* x = biomass concentration, p = product concentration, q_p = specific rate of product formation.

16.4.2 การเสื่อมสลายของกิจกรรมสังเคราะห์

หลังจากการเจริญเติบโตหยุดลงอัตราความเร็วในการสังเคราะห์ผลผลิตในที่สุดก็เสื่อมลง การเสื่อมลงบางครั้งเริ่มขึ้นเมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตตกลงถึงค่าวิกฤติอันหนึ่งซึ่งใกล้กับศูนย์ ถ้าถือว่า q_p คงที่จนกระทั่งการเจริญเติบโตหยุดลงที่เวลา t ต่อมาจะพบว่า q_p ลดลงดังแสดงในรูปที่ 16.1 ในระยะเสื่อมลงของกิจกรรมสังเคราะห์ถ้าพิจารณาการผลิตด้วยช่วงเวลาอันสั้น dt จะได้ว่า

$$dp = x_m q_p \, dt \qquad 16.16$$

ซึ่ง x_m คือความเข้มข้นสูงสุดของชีวมวล ความเข้มข้นของผลผลิตที่เพิ่มขึ้นอาจถูกกำหนดได้จากสมการคือ

$$\int_{p_1}^{p_2} dp = x_m \int_{t_1}^{t_2} q_p \, dt \qquad 16.17$$

ซึ่ง p_1 และ p_2 คือความเข้มข้นของผลผลิตที่เวลา t_1 และ t_2 ตามลำดับ (รูปที่ 16.1)

ค่าอินทีเกรตของ $q_p\,dt$ คือพื้นที่ภายใต้เส้นกราฟ q_p และ t จาก t_1 ถึง t_2 ถ้าการเสื่อมลงของกิจกรรมเอนไซม์เป็นไปแบบขยายหรือการเสื่อมลงของเอนไซม์ดำเนินไปเป็นแบบปฏิกริยาลำดับที่หนึ่งดังนั้น $dq_p/dt = Kq_p$ ซึ่ง K คือค่าคงที่ และ

$$q_p = q_{p(0)}\,e^{-Kt} \qquad 16.18$$

ดังนั้น

$$\log q_p = \log q_{p(0)} - \frac{K}{2{\cdot}30}\,t \qquad 16.19$$

และความลาดเอียงของเส้นกราฟก็คืออัตราความเร็วในการเสื่อมสลายคงที่ K ช่วงเวลาครึ่งชีวิตของกิจกรรมจะเป็น $(\ln 2)/K$ การเสื่อมลงแบบขยายของกิจกรรมการสังเคราะห์ถูกพบว่าเกิดขึ้นได้ในระบบเอนไซม **glucoside 3-dehygrogenase** ของ **Agrobacterium (Fenson & Pirt, 1972)** ซึ่งมีเวลาครึ่งชีวิตต่ำสุดประมาณ 8 ชั่วโมง ในกรณีของการสังเคราะห์เพ็นนิซิลลินการเสื่อมลงถูกพบว่าค่อนข้างเป็นเส้นตรงมากกว่าเป็นแบบขยาย(**pirt & Righelato, 1967**)

16.5 การเกิดผลผลิตจากการหมักแบบคงที่ทางเคมี

16.5.1 ลักษณะโดยทั่วไป

อัตราความเร็วในการเกิดผลผลิตจากการหมักแบบคงที่ทางเคมีถูกกำหนดได้โดยสมการ

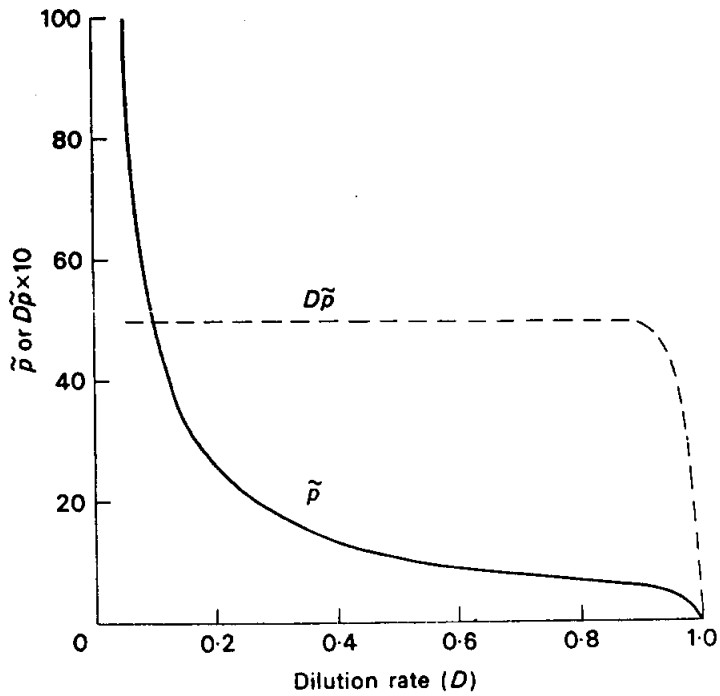
$$dp/dt = q_p x - Dp \qquad 16.20$$

และอยู่ในสถานะมั่นคงคือเมื่อ $dp/dt = 0$

$$\tilde{p} = q_p \tilde{x}/D \qquad 16.21$$

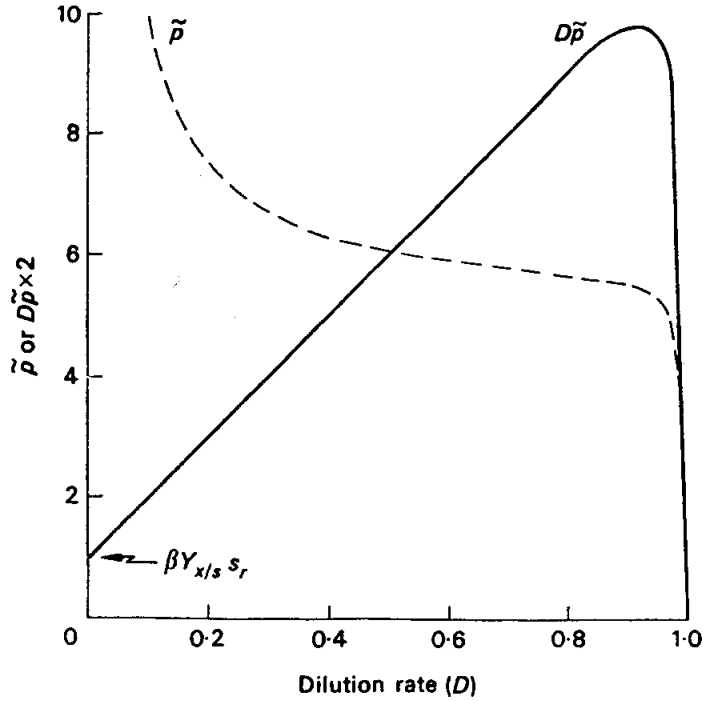
ถ้าผลผลิตเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตอย่างเข้มงวดก็อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของผลผลิตและอัตราความเร็วในการออกมาของผลผลิต ($D\tilde{p}$) มีการเปลี่ยนแปลงตามค่า D ด้วยวิถีทางเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงชีวมวล ถ้าค่า q_p เป็นอิสระจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตความเข้มข้นของผลผลิตจะเปลี่ยนแปลงกลับกันกับอัตราความเร็วในการเจือจาง และตลอดช่วงอันกว้างของอัตราความเร็วในการเจือจางที่เปลี่ยนแปลงไปก็ยัง

คงมีอัตราความเร็วในการออกมาคงที่ (รูปที่ 16.2) อย่างไรก็ตามขณะที่ $D \to 0$ ในที่สุด q_p ซึ่งคงที่ก็จะเปลี่ยนแปลง เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มเสื่อมสลายหรือซับสเตรตที่ต้องการเริ่มหมดไปอย่างใดอย่างหนึ่ง



รูปที่ 16.2 Non-growth-linked product formation in a chemostat culture when q_p is independent of growth rate. *Parameters:* concentration of substrate in feed medium $s_r = 10$, $K_s = 0{\cdot}01$, $Y_{x/s} = 0{\cdot}5$, $\mu_m = 1{\cdot}0$, $q_p = 1{\cdot}0$, $\tilde{p}$ = steady-state product concentration, $D\tilde{p}$ = output rate for product.

ถ้าผลผลิตที่เกิดขึ้นมีส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตแต่อีกส่วนหนึ่งเป็นอิสระจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต (สมการที่ 16.10) ความเข้มข้นของผลผลิตจะเปลี่ยนแปลงตามอัตราความเร็วในการเจือจางดังแสดงในรูปที่ 16.3 อัตราความเร็วในการออกมาของผลผลิตเมื่อ $D=0$ ก็จะเป็นส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตคือ $\beta\bar{x} = \beta Y_{x/s} S_r$



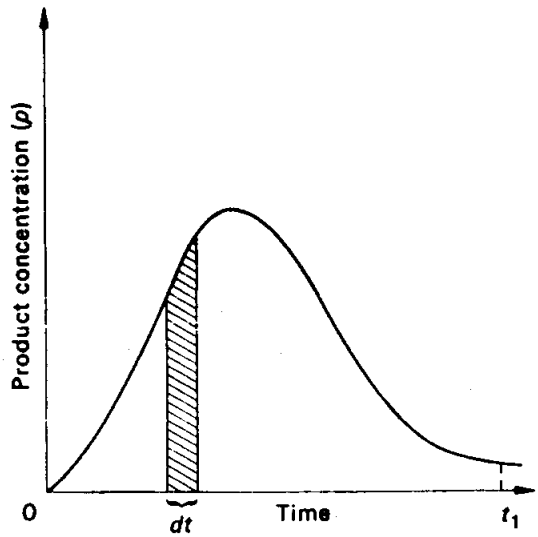
รูปที่ 16.3 Concentration ($\tilde{p}$) and output rate ($D\tilde{p}$) of product from chemostat culture when product formation is partly growth-linked, that is $q_p = Y_p\mu + \beta$. *Parameters:* concentration of substrate in medium feed $s_r = 10$, $K_s = 0{\cdot}01$, $Y_{x/s} = 0{\cdot}5$, $Y_{p/x} = 1{\cdot}0$, $\beta = 0{\cdot}1$.

16.5.2 การผลิตชั่วขณะ

ถ้าผลผลิตถูกทำให้เกิดขึ้นได้อย่างชั่วขณะในการหมักแบบคงที่ทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 16.4 ผลผลิตสะสมที่ออกมา (p_c) ตั้งแต่เริ่มต้นเกิดผลผลิตถูกกำหนดได้โดยสมการ

$$p_c = D\int_0^{t_1} p\,dt \qquad 16.22$$

ค่าอินตีเกรตของ $p\,dt$ ก็คือพื้นที่ใต้เส้นกราฟ p, t (รูปที่ 16.4) ระหว่างเวลาศูนย์ถึง วิธีการนี้ถูกใช้เพื่อประเมินผลผลิตสะสมของอินเทอร์ฟีรอนในการหมักแบบคงที่ทางเคมี **(Tovey et al., 1973)**



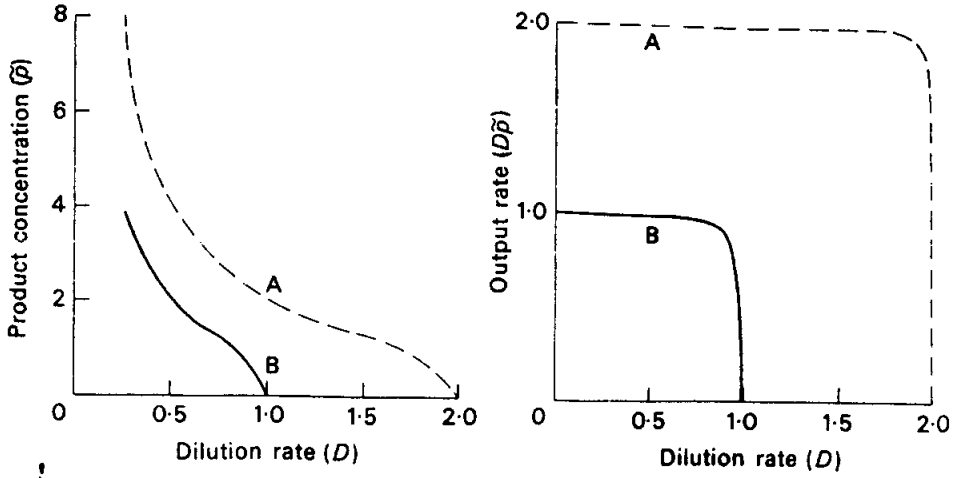
รูปที่ 16.4 Transient formation of product in a chemostat culture with constant biomass and constant dilution rate.

16.5.3 ผลกระทบจากความเข้มข้นของชีวมวล

วิถีทางหนึ่งเพื่อเพิ่มอัตราความเร็วในการเกิดผลผลิตคือการเพิ่มความเข้มข้นของชีวมวล(สมการที่ 16.11) วิธีการเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของชีวมวลอาจทำได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต หรือโดยกำจัดผลผลิตต่าง ๆ ที่ยับยั้งการเจริญเติบโต หรือใช้วิธีการบางอย่างในการเติมชีวมวลย้อนกลับ (ตอนที่ 6.3)

ถ้าการเติมชีวมวลย้อนกลับถูกใช้เมื่อพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิต ($Y_{p/x}$) คงที่และผลผลิตเป็นสารซึ่งถูกขับออกมานอกเซลล์และเป็นสารที่ละลายน้ำได้ความเข้มข้นของผลผลิตก็อาจเพิ่มขึ้นได้ไม่เกินค่า $Y_{p/s}S_r$ ซึ่ง S_r คือความเข้มข้นของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในสื่อกลางอาหารที่เติมลงไป ในกรณีนี้การเพิ่มขึ้นของอัตราความเร็วในการออกมาของผลผลิตอาจทำได้โดยเพิ่มอัตราความเร็วในการเจือจาง

เมื่อ q_p เป็นอิสระจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของผลผลิตที่อยู่นอกเซลล์ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีด้วยการยอนกลับของชีวมวลจะมากกว่าในการหมักแบบคงที่ทางเคมีอย่างง่ายดายด้วยปัจจัยเท่ากับสัดส่วนความเข้มข้นของชีวมวลในทั้งสองระบบ (รูปที่ 16.5) ปัจจัยนี้ในทางปฏิบัติก็เหมือนกันกับปัจจัยความเข้มข้นและอัตราความเร็วในการออกมาก็ถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้ด้วยปัจจัยเดียวกัน



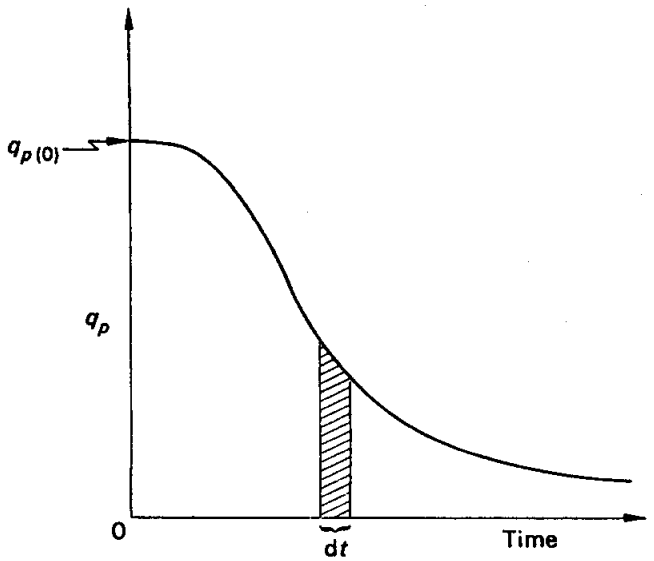
รูปที่ 16.5 Product concentration, $\tilde{p}$ and output rate, $D\tilde{p}$ in chemostat culture with biomass feedback (broken line A) and without feedback (continuous line B) when q_p is constant; biomass 'concentration' factor = 2.

ในขบวนการเช่นการผลิตเพ็นนิซิลลินซึ่งการเสื่อมลงของกิจกรรมการผลิตจะเริ่มขึ้นเมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่ำลงมาถึงขนาดหนึ่ง อัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤตในการหมักแบบคงที่ทางเคมีจำเป็นต้องรักษาค่า q_p ซึ่งจะถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้ด้วยปัจจัยความเข้มข้น (α) เนื่องจาก $\mu = \alpha D$ ในสถานะมั่นคง

16.5.4 การเสื่อมลงของกิจกรรมสังเคราะห์ในชีวมวลที่ไม่มีการเจริญเติบโต

ที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่ำหรือเป็นศูนย์การสังเคราะห์ผลผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตจะเสื่อมลง การเสื่อมลงของกิจกรรมสังเคราะห์ในชีวมวลที่ไม่มีการเจริญเติบโตภายใต้การหมักแบบคงที่ทางเคมีถูกทำเป็นแบบจำลองได้โดยวิถีทางดังต่อไปนี้ สมมุติว่าการหมักแบบคงที่ทางเคมีสองขั้นตอนถูกทำให้ต่อติดกันเป็นลำดับ

(ตอนที่ 6.4.1) จนกระทั่งมีการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมตามต้องการปรากฏขึ้นในการหมักขั้นตอนที่หนึ่ง แต่เกิดผลผลิตโดยไม่มีการเจริญเติบโตของชีวมวลปรากฏขึ้นในขั้นตอนที่สอง และถือว่าการหมักในขั้นตอนที่สองถูกป้อนด้วยซับสเตรตที่จำเป็นทุกอย่าง เพื่อการสังเคราะห์ที่ต้องการ สมมุติว่าในขั้นตอนที่สองชีวมวลถูกป้องกันไม่ให้มีการเจริญเติบโตโดยการหมดไปของซับสเตรตบางอย่าง แต่ถ้าซับสเตรตนั้นทำหน้าที่เป็นแหล่งของพลังงานก็จำเป็นต้องเติมลงไปพอให้เป็นเสบียงเพื่อการทำนุบำรุงเท่านั้น จนกระทั่งมีชีวมวลคงที่ จึงถือได้ว่ากิจกรรมการสังเคราะห์ของชีวมวลเสื่อมลงตามปัจจัยบางอย่างของเวลาดังแสดงในรูปที่ 16.6



รูปที่ 16.6 Decay of synthetic activity (q_p) in an element of biomass as a function of time.

ถ้าให้ df เป็นส่วนของชีวมวลที่มีช่วงระยะเวลาคงอยู่ระหว่าง t ถึง $t+dt$ ดังนั้นอัตราความเร็วในการผลิตที่ได้จากชีวมวลในช่วงระยะเวลาคงอยู่ระหว่าง t และ dt คือ

$$(dp/dt)_t = q_p x\, df \qquad 16.23$$

ซึ่ง x คือความเข้มข้นของชีวมวล จากลักษณะการกระจายของระยะเวลาคงอยู่ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีทำให้สามารถแทนค่า $df = D\,e^{-Dt}\,dt$ ได้ดังในตอนที่ 5.4 เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงอัตราความเร็วในการผลิตทั้งหมด (dp/dt) จะเป็นผลรวมของอัตราความเร็วในผลิต

ย่อยทั้งหมดในช่วงระหว่างระยะเวลาคงอยู่จาก 0 ถึง τ ซึ่ง τ คือเวลาเมื่อ $q_p=0$ ดังนั้น

$$\sum (dp/dt)_i = dp/dt = xD \int_0^{\tau} q_p \, e^{-Dt} \, dt \qquad 16.24$$

ถ้าให้ D_{12} เป็นเศษส่วนของอัตราความเร็วในการเจือจางจากขั้นตอนแรกไปยังขั้นตอนที่สองของขบวนการหมัก ดังนั้นอัตราความเร็วในการออกมาของผลผลิตสำหรับขั้นตอนที่สอง เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงอาจถูกกำหนดได้จากความสมดุลย์คือ

$$\text{output} = \text{input} + \text{production}$$

นั่นก็คือ

$$D_2\tilde{p}_2 = D_{12}\tilde{p}_1 + D_2\tilde{x}_2 \int_0^{\tau} q_p \, e^{-D_2 t} \, dt \qquad 16.25$$

ซึ่ง $\tilde{p}_1$ และ $\tilde{p}_2$ คือความเข้มข้นของผลผลิตจากการหมักในขั้นตอนที่หนึ่งและที่สองตามลำดับ และ $\tilde{x}_2$ คือความเข้มข้นของชีวมวลในขั้นตอนที่สอง ค่าของ q_p ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งของ t อาจถูกตรวจสอบได้จากการทดลองโดยการหมักแบบคงที่ทางเคมีขั้นตอนเดียวด้วยอัตราการไหลของสื่อกลางอาหารและสภาวะอื่น ๆ ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปเพื่อหยุดยั้งการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้เกิดสภาวะต่าง ๆ ขึ้นในขั้นตอนที่สอง (**Pirt & Righelato, 1967**) การอินทีเกรตสมการที่ 16.25 อาจถูกประเมินได้จากกราฟหรือจากการวิเคราะห์ต่าง ๆ ในกรณีของการหมักเพ็นนิซิลลิน **Pirt & Righelato (1967)** พบว่าอัตราการตกลงของ q_p จะคงที่ตามสมการคือ

$$q_p = q_{p(0)} - k_p t \qquad 16.26$$

แทนค่าสำหรับ q_p ในสมการที่ 16.25 ความเข้มข้นของเพ็นนิซิลลินในขั้นตอนที่สองอาจถูกทำนายได้จากความสัมพันธ์คือ

$$\tilde{p}_2 = \frac{D_{12}}{D_2}\tilde{p}_1 + \frac{\tilde{x}_2}{D_2}\left\{(e^{-D_2 q_{p(0)}/k_p} - 1)\frac{k_p}{D_2} + q_{p(0)}\right\} \qquad 16.27$$

ซึ่งระยะเวลาเมื่อกิจกรรมการสังเคราะห์เพ็นนิซิลลินมีค่าเท่ากับศูนย์ถูกกำหนดโดย $q_{p(0)}/k_p$

ถ้าการเสื่อมลงของกิจกรรมเป็นแบบชยายก็อาจเขียนเป็นสมการได้ว่า $q_p = q_{p(0)} e^{-Kt}$ ซึ่ง K คืออัตราความเร็วคงที่ในการเสื่อมลง เมื่อแทนค่า q_p ในสมการที่ 16.25 จะได้ความเข้มข้นของผลผลิตดังสมการคือ

$$\tilde{p}_2 = \frac{D_{12}}{D_2}\tilde{p}_1 + \tilde{x}_2 q_{p(0)}/(K + D_2) \qquad 16.28$$

16.6 การควบคุมการเสื่อมลงของกิจกรรมการสังเคราะห์

ปัญหาการรักษาไว้ซึ่งกิจกรรมการสังเคราะห์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการหมักเมตาโบไลต์ทุติยภูมิเช่น การผลิตเพ็นนิซิลลิน สาเหตุพื้นฐานสี่ประการในการเสื่อมลงของกิจกรรมการสังเคราะห์อาจถูกจำแนกได้ดังต่อไปนี้คือ (1) การยับยั้งโดยเมตาโบไลต์หรือผลผลิต (2) การสูญเสียเมตาโบไลต์สื่อกลางด้วยการแพร่กระจายออกจากชีวมวล (3) การยับยั้งเอนไซม์แบบถาวรที่ย้อนกลับไม่ได้ดังได้บรรยายมาแล้วในเรื่องเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์กลูตามีน (Holzer & Duntze, 1971) (4) การสลายตัวแบบย้อนกลับไม่ได้ของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ สาเหตุที่สี่เป็นสาเหตุที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง (Thurston, 1972)

สำหรับ Penicillium chrysogenum ซึ่งใช้ในการผลิตเพ็นนิซิลลิน ขบวนการเสื่อมลงในการผลิตจะเกิดขึ้นที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่ำกว่า $0.014\ h^{-1}$ (Pirt & Righelato, 1967) และอัตราความเร็วในการเสื่อมลงเมื่อการเจริญเติบโตหยุดลงจะเปลี่ยนแปลงกลับกันกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตที่ผ่านมา แตกต่างจากการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ 3-ketodehydrogenase จาก Agrobacterium ในเซลล์ที่ไม่มีการเจริญเติบโตคือไม่ขึ้นอยู่กับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตที่แล้วมา (Kurowski et al., 1973) ในกรณีหลังนี้ซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตมีอิทธิพลบางประการต่ออัตราความเร็วในการเสื่อมลง อิทธิพลนี้จะมีน้อยมากเมื่อใช้คาร์บอนเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตแต่จะมีอิทธิพลมากที่สุดเมื่อใช้ฟอสเฟตเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต

การสลายตัวของเอนไซม์เนื่องจากการผันเวียนโปรตีนเป็นสิ่งซึ่งมีอยู่เสมอในเซลล์ที่ไม่มีการเจริญเติบโต ดังนั้นสิ่งที่ใช้ยับยั้งการผันเวียนโปรตีนอาจลดการเสื่อมสลายลงของเอนไซม์ให้น้อยลงได้ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของชีวมวลในขณะที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเข้าใกล้ศูนย์จะได้บรรยายในบทที่ 18

16.7 ผลกระทบของสภาวะแวดล้อมต่อการเกิดผลผลิตจากการหมัก

16.7.1 คำนำทั่วไป

อิทธิพลของปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่อการเกิดผลผลิตจากการหมักได้ถูกแสดงออกในรูปของความเข้มข้นสูงสุดหรือความเข้มข้นสุดท้ายของผลผลิตโดยมีข้อยกเว้นในบางกรณี อย่างไรก็ตามผลกระทบทั้งหมดนี้ได้ถูกกำหนดโดยปัจจัยซึ่งเป็นอิสระต่อกันดังต่อไปนี้ (1) ความเข้มข้นของชีวมวล (2) อัตราความเร็วในการเกิดผลผลิตเฉพาะ q_p (3) พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเกิดผลผลิตจากซับสเตรต $Y_{p/s}$ (4) ระยะเวลาสำหรับกิจกรรมในการสังเคราะห์ (5) อัตราความเร็วในการสลายตัวของผลผลิต แต่ในท้ายที่สุดเพื่อความเหมาะสมก็จำเป็นต้องวิเคราะห์ในรูปของปัจจัยทั้งห้าอย่างนี้ อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของชีวมวลมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อผลกระทบสำหรับค่า q_p

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเหนี่ยวนำให้เกิดกิจกรรมในการสังเคราะห์อาจแตกต่างจากสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดผลผลิต ตัวอย่างเช่นการผลิตไรโบฟลาวินดังในตอนที่ 13.5

ผลกระทบต่าง ๆ ที่มีประโยชน์คือผลกระทบที่ทำให้เกิดผลผลิตเพิ่มขึ้น ผลกระทบเนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ ทางเคมีฟิสิกส์ เช่น อุณหภูมิ พีเอช โทนิซิตี้ และความเครียดออกซิเจนที่ละลายได้กล่าวถึงมาแล้วดังในบทต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้โดยเฉพาะ ปัจจัยทางโภชนาการที่มีความสำคัญคือ ธรรมชาติของสารอาหารโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน, ความเข้มข้นของซับสเตรตโดยเฉพาะในแง่ที่ว่าซับสเตรตนั้นเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตหรือไม่ และการเติมหรือจัดให้มีสื่อชักนำและสิ่งกระตุ้นการผลิต

16.7.2 แหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอน

การมีแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนบางชนิดมากเกินไปอาจยับยั้งการเกิดผลผลิตได้ทั้งนี้อาจเนื่องจากกลไกการสกดที่เรียกว่า **catabolite repression** **(Demain, 1972b)**

ตัวอย่าง เช่นการยับยั้งการผลิตเพ็นนิซิลลินและการผลิตดิพที่เรียทอกซินโดยน้ำตาลกลูโคสที่เข้มข้นมากเกินไป (**Righelato & Van Hemert, 1969b**) การสกดอาจถูกแก้ไขได้โดยการเลือกสรรเปลี่ยนแหล่งชาตุคาร์บอนเสียใหม่ ตัวอย่าง เช่นใช้น้ำตาลแลคโตสสำหรับการผลิตเพ็นนิซิลลิน หรือใช้น้ำตาลมอลโตสสำหรับการผลิตดิพที่เรียทอกซิน หรือโดยการเติมให้อย่างต่อเนื่องทีละน้อยด้วยแหล่งชาตุคาร์บอนจนกระทั่งไม่ปรากฏว่ามีมากเกินไป การใช้แหล่งชาตุคาร์บอนหลายแหล่งปะปนกันอาจให้ผลผลิตดีกว่าการใช้แหล่งชาตุคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว ตัวอย่าง เช่นการเติมอะซีเตตปนลงไปในสื่อกลางน้ำตาลกลูโคสจะช่วยเพิ่มผลผลิตกรดกลูตามิกโดยเชื้อ **Corynebacterium** (**Aida, 1972,p.xviii**) มีบ่อยครั้งที่เดียวที่ส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรตและไขมันถูกพบว่าให้ผลดีกว่าการใช้คาร์โบ-ไฮเดรตอย่างใดอย่างหนึ่ง เป็นแหล่งชาตุคาร์บอนแต่เพียงแหล่งเดียวสำหรับการหมักสารปฏิชีวนะต่าง ๆ

16.7.3 แหล่งชาตุไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ แอมโมเนีย ไนเตรต กรดอะมิโน เพ็นโตน และโปรตีน แอมโมเนียที่มากเกินไปอาจยับยั้งการผลิตกรดกลูตามิกโดย **Corynebacterium** ได้และด้วยเหตุนี้จึงต้องค่อยเติมแหล่งแอมโมเนียให้แก่เชื้อจุลินทรีย์ทีละน้อยเป็นระยะ ๆ (**Kinoshita, 1972,p. 267**)ในแง่ที่แตกต่างออกไปคือแอมโมเนียไอออนที่เข้มข้นสูงก็เป็นที่ชื่นชอบต่อการผลิตแอล-โพรลีนโดย **Brevibacterium** (**Okumura, 1972**) แหล่งชาตุไนโตรเจนซับซ้อนเช่น น้ำแช่เมล็ดข้าวโพด โปรตีนจากพืช หรือปลามักกระตุ้นให้เกิดการผลิตเมตาโบไลต์ทุติยภูมิด้วยเหตุผลของกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด

16.7.4 การขาดแคลนสารอาหาร

การทำให้เกิดผลผลิตมักถูกกระตุ้นจากการขาดแคลนสารอาหาร การจำกัดฟอสเฟตจะช่วยกระตุ้นการหมักให้เกิดสารปฏิชีวนะบางชนิด (**Demain, 1972b**) การขาดแคลนชาตุปลีกย่อยช่วยกระตุ้นการผลิตกรดซิตริกโดย **Aspergillus niger** และไรโบฟลาวินโดยยีสต์ แต่ทั้งนี้ก็จำเป็นต้องกระทำให้แน่ใจว่าผลกระทบจากการจำกัดซับสเตรตไม่ได้ถูกปิดบังโดยผลของการยับยั้ง เช่น การสกดโดยเมตาโบไลต์เนื่องจากมีซับสเตรตอื่นมากเกินไป

การขาดแคลนไบโอตินช่วยกระตุ้นให้เกิดการผลิตกลูตาเมตอย่างมากมาย โดยเชื้อ **Corynebacterium** ผลกระทบเช่นนี้ได้รับการส่งเสริมจากเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งยอมให้กลูตาเมตซึมผ่านได้เพิ่มขึ้น (**Kinoshita, 1972, p.314**) ในกรณีที่มีไบโตตินเข้มข้นสูงมากเกินไปกรดกลูตามิกจำนวนมากจะปรากฏอยู่แต่ภายในเซลล์เนื่องเยื่อหุ้มเซลล์ช่วยป้องกันไม่ให้กรดอะมิโนนี้หนีออกมานอกเซลล์ได้ (**Demain, 1972b**) การขับกรดกลูตามิกออกนอกเซลล์แบคทีเรียที่เจริญเติบโตอยู่ในสภาพที่มีไบโอตินมากเกินไปอาจทำได้โดยเติมเพ็นนิซิลลินหรือสารที่มีผลกระทบต่อผิวเซลล์ลงไปในสื่อกลางอาหาร ผลกระทบเช่นนี้ปรากฏว่าเป็นผลเนื่องมาจากชั้นของผิวเซลล์แบคทีเรียถูกทำให้แตกแยกจึงยอมให้กรดกลูตามิกซึมผ่านไปได้ (**Kinoshita, 1972**)

16.7.5 <u>สื่อชักนำให้เกิดการผลิต</u>

การเติมสื่อชักนำการผลิตมักกระตุ้นให้มีการสร้างผลผลิต ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือการกระตุ้นการผลิตเพ็นนิซิลลินโดยการเติมกรดเฟนิลอะซิติกซึ่งเป็นสื่อโครงสร้างด้านข้างของเพ็นนิซิลลิน-จี ลงไป สื่อชักนำการผลิตจะเพิ่มค่า ได้เป็นหลายเท่าและโน้มนำไปสู่การผลิตเพ็นนิซิลลิน-จีมากกว่าการผลิตเพ็นนิซิลลินพวกอื่น ตัวอย่างของสื่อชักนำการผลิตอย่างอื่นที่ช่วยกระตุ้นการหมักได้ถูกกล่าวถึงโดย **Demain (1972b)**

16.7.6 <u>สิ่งกระตุ้นการผลิต</u>

คำว่าสิ่งกระตุ้นหมายถึงสารที่ไม่ใช่สื่อชักนำการผลิตซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลผลิตหรือเป็นส่วนประกอบส่วนหนึ่งในโครงสร้างของผลผลิตได้ แต่สามารถกระตุ้นให้เกิดผลผลิตต่าง ๆ ได้โดยเฉพาะ การใช้สิ่งกระตุ้นเหล่านี้ได้ถูกบรรยายสรุปโดย **Perlman (1973)** ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือการใช้เมไทโอนีนหรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันและนอร์ลิวซีนเพื่อกระตุ้นการผลิตซีฟาโลสปอริน-ซี (**Drew & Demain, 1973**) บาร์บิทูเรตถูกใช้เพื่อควบคุมการหมักริฟาไมซินในการทำให้เกิดเป็นสารปลีกย่อยของริฟาไมซินอย่างหนึ่งได้โดยเฉพาะ (**Margalith & Pagani, 1961**) การออกซิเดชั่นของโคเลสทีรอลโดยจุลินทรีย์ไปเป็น **androstadiene-3, 17-dione** อาจถูกกระตุ้นได้ด้วยสารคีเลติ้ง-เอเจนต์ (**Perlman, 1973**) การผลิตกรดซิตริกโดย **Aspergillus** อาจถูกกระตุ้นได้

ด้วยเมทานอลหรือโพรพานอล (**Moyer, 1953**) ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารเหล่านี้มีผลกระทบต่อการยอมให้ซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยความเกี่ยวข้องกันนี้สิ่งที่มีอิทธิพลต่อผิวเซลล์ก็อาจกระตุ้นให้เกิดการผลิตไรโบฟลาวินโดยยีสต์ได้ (**Demain, 1972b**) และการผลิตเอนไซม์บางชนิดที่ใช้ร่วมในขบวนการย่อยสลายซับสเตรตเมื่อเริ่มต้นก็เช่นเดียวกัน (**Reese, 1972**) เบ็นซิลไทโอไซยาเนตสามารถกระตุ้นการหมักคลอเตตราไซคลีนได้ (**Hostalek dt al., 1969**) การผลิตดีเมทอลคลอเตตราไซคลีนถูกกระตุ้นโดยการเติมซัลโฟนาไมด์หรืออีไทโอนีนลงไปในเชื้อจุลินทรีย์เพื่อยับยั้งระบบเอนไซม์ในขบวนการเมทีเลชั่นเบนซิมิดาโซลยับยั้งการเจริญเติบโตของ **Saccharomyces cerevisiae** และกระตุ้นให้เกิดการขับแซนทีนออกมา (**Evans & Brown, 1973**) โดยทั่วไปกลไกการทำงานของสิ่งกระตุ้นการผลิตยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่บางชนิดก็อาจกระทำโดยการยับยั้งหรือกระตุ้นปฏิกริยาของเอนไซม์โดยเฉพาะ.