บทที่ 3
ตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์และธรรมชาติ
แห่งการเคลื่อนไหวในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

3.1 ตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์ในการเจริญเติบโต
(GROWTH PARAMETERS)

การสังเกตุดูการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มีประโยชน์ต่อการหมักหลายกรณี แต่ถ้าต้องการให้ได้รายละเอียดมากยิ่งขึ้นจำเป็นต้องวัดอัตราการเจริญเติบโตในแง่ของปริมาณซึ่งอาจถูกเสนอออกมาในรูปของเส้นกราฟชีวมวล(biomass) ต่อเวลา ตัวเลขต่าง ๆ อาจถูกทำให้มีความหมายมากยิ่งขึ้นและสั้นจุใจความได้มากถ้าทำการวิเคราะห์ในรูปของตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์เกี่ยวกับการเจริญเติบโตเช่น อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ(specific growth rate) หรือระยะเวลาทวีคูณ(doubling time) ของชีวมวล ระยะเวลาปรับตัวก่อนมีการเจริญเติบโตหรือระยะเวลาล้าหลังในการเจริญเติบโต (growth lag) พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต (growth yield) ผลหารการเมตาโบลิซึ่ม (metabolic quatient) ของปริมาณซับสเตรต (substrate) ที่ใช้กับผลผลิตที่เกิดขึ้น ความสัมพันธ์หรือความสัมพรรคภาคกันของซับสเตรต (substrate affinity) กับปริมาณสูงสุดของชีวมวล

ค่าตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์เกี่ยวกับการเจริญเติบโตถูกกำหนดขึ้นจากการอ้างอิงถึงการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นเนื้อเดียวกันแบบเก็บกักอย่างง่าย (homogeneous batch culture) ระบบนี้ประกอบขึ้นด้วยสื่อกลางอาหารเหลว (medium) กับเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งผสมรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันอย่างดีตลอดเวลาในภาชนะเก็บกักโดยไม่มีการถ่ายเทเซลล์หรืออาหารเข้าออกจากภาชนะในขณะทำการหมักหรือเพาะเลี้ยง ระบบนี้ถูกถือว่ามีการผสมรวมตัวกันอย่างเพียงพอจนกระทั่งชีวมวลกระจายไปอย่างทั่วถึงสม่ำเสมอในสื่อกลางอาหารและปราศจากความเข้มข้นซึ่งแตกต่างกันในสื่อกลางนี้ ส่วนในกรณีของเชื้อซึ่งไม่ผสมรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน (heterogeneous culture)เช่น

โคโลนี(colony) ที่เจริญเติบโตอยู่บนผิวของสื่อกลางอาหารนั้นมีความยุ่งยากซับซ้อนมากกว่าและจะได้กล่าวถึงในบทที่ 22 ต่อไป

3.2 อัตราความเร็วในการเจริญเติบโต (GROWTH RATE)

อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ซึ่งมีการเจริญเติบโตแบบขยาย(exponential growth) อาจแสดงออกได้ในรูปของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะระยะเวลาในการทวีคูณ จำนวนชั่วอายุ หรือส่วนกลับของระยะเวลาในการทวีคูณ

3.2.1 อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ(SPECIFIC GROWTH RATE)

สภาวะที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของชีวมวลในเชื้อใดเชื้อหนึ่งก็คือ (1) แหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum) ที่มีชีวิต (2) แหล่งพลังงาน (3) สารอาหารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ชีวมวล (4) การปราศจากสิ่งยับยั้งต่าง ๆ (inhibitors) ที่ป้องกันการเจริญเติบโต (5) มีสภาพแวดล้อมทางเคมีและกายภาพที่เหมาะสม

เมื่อมีสิ่งต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตอยู่อย่างพร้อมมูลและเหมาะสมแล้ว ในช่วงระยะเวลาอันสั้น (dt) จะพบว่ามีชีวมวลเพิ่มขึ้น (dx) อย่างเป็นปฏิภาคโดยตรงต่อช่วงระยะเวลาและปริมาณของชีวมวลที่ปรากฏอยู่ก่อนแล้ว (x) จึงเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$dx = \mu x.dt \qquad 3.1$$

หรือ

$$dx/dt = \mu x \qquad 3.2$$

สัดส่วนของชีวมวลที่เพิ่มขึ้นต่อเวลา (dx/dt) ถือว่าเป็นอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของประชากร μ เป็นตัวแปรเสริมทางคณิตศาสตร์หมายถึงอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่อหนึ่งหน่วยปริมาณของชีวมวลเรียกว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ(specific growth rate) มีค่าเท่ากับ $(1/x)(dx/dt)$ ดังสมการที่ 3.2 และมีหน่วยเป็นส่วนกลับของเวลาคือ $(1/t)$ อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ

ก็คล้ายกันกับอัตราการได้รับผลประโยชน์เป็นดอกเบี้ยจากการให้กู้เงินหรือฝากธนาคาร เช่น ถ้าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะเป็น 0.1 h^{-1} จะหมายถึงอัตราการได้รับผลประโยชน์หรือการได้รับชีวมวลเพิ่มขึ้น 10% ต่อทุกหนึ่งชั่วโมงถัดมาของชีวมวลเริ่มต้นเสมอและชีวมวลหรือผลประโยชน์ที่เพิ่มขึ้นมานี้ก็คิดรวมเป็นชีวมวลเริ่มต้นหรือการลงทุนเริ่มต้นของชั่วโมงถัดไปอีกในทำนองเดียวกันกับการคิดดอกเบี้ยทบต้น

ถ้าสภาวะซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ถูกทำให้คงที่อยู่ตลอดเวลา ค่าของอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ μ ก็คงที่ด้วย

เมื่อ μ คงที่ถ้าอิตีเกรตสมการที่ 3.2 ตามหลักวิชาคณิตศาสตร์จะได้ว่า

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \qquad 3.3$$

x_0 คือชีวมวลเริ่มต้น x คือชีวมวลที่ปรากฏเมื่อครบกำหนดเวลา t ถ้าเขียนกราฟของ $\ln x$ กับเวลาจะได้กราฟเส้นตรงโดยมีความลาดชัน (slope) เท่ากับ μ ถ้าเปลี่ยนลอก (logarithms) ให้เป็นฐาน 10 ก็จะได้สมการที่ 3.3 เป็น

$$\log x = \frac{\mu t}{2.30} + \log x_0 \qquad 3.4$$

สมการที่ 3.3 อาจถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแบบของ

$$\ln (x/x_0) = \mu t \qquad 3.5$$

หรือ

$$x = x_0 e^{\mu t} \qquad 3.6$$

การเจริญเติบโตที่สอดคล้องตามสูตรนี้ถูกเรียกว่าการเจริญเติบโตแบบขยายคงที่ (constant exponential growth) หรือการเจริญเติบโตแบบลอกการิทมิคคงที่ (constant logarithmic growth) ซึ่งก็คือการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือเซลล์ที่อยู่ในระยะลอกการิทมิค (logarithmic phase) หรือระยะขยาย (exponential phase) การหาค่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะเป็นการตรวจสอบอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตขั้นพื้นฐานของเซลล์หรือจุลินทรีย์โดยทั่วไป ส่วนการตรวจสอบอย่างอื่นที่จะกล่าวถึงต่อไปนั้นสามารถถูกทำให้มีความสัมพันธ์กันกับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะได้

3.2.2 ระยะเวลาในการทวีคูณหรือระยะเวลาชั่วอายุ (DOUBLING TIME OR GENERATION TIME)

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะและระยะเวลาในการทวีคูณ (t_d) ของชีวมวลอาจหาได้จากสมการที่ 3.5 โดยกำหนดให้ $x=2x_0$ และ $t=t_d$ ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์หรือเซลล์เมื่อเจริญเติบโตจนครบกำหนดเวลาชั่วอายุแล้วจะเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของจำนวนเริ่มต้นเสมอ ดังนั้น

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0{\cdot}693}{\mu} \qquad 3.7$$

3.2.3 จำนวนชั่วอายุหรือระดับของการเพิ่มจำนวน (NUMBER OF GENERATION OR DEGREE OF MULTIPLICATION)

ถ้าชีวมวลมีการทวีคูณ n ครั้งหรือ n ชั่วอายุก็อาจเขียนเป็นสมการ (Pelczar et. al, 1977, P.122) ได้ว่า

$$x/x_0 = 2^n \qquad 3.8$$

โดยแท้จริงแล้ว x/x_0 ก็คือ $e^{\mu t}$ ดังในสมการที่ 3.6 จากสมการที่ 3.8 จะได้ว่า

$$n = 3{\cdot}32 \log (x/x_0) \qquad 3.9$$

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการทดสอบมักนิยมใช้ขนาดของแหล่งเชื้อจุลินทรีย์(inoculum size) หรือจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น x_0 เป็น 10% ของชีวมวลตายที่ต้องการ ดังนั้น n จึงเท่ากับ 3.32

3.2.4 ส่วนกลับของระยะเวลาในการทวีคูณ (RECIPROCAL DOUBLING TIME)

เนื่องจากจำนวนครั้งในการทวีคูณ n ของชีวมวลในชั่วระยะเวลา t เท่ากับ t/t_d ดังนั้นสมการที่ 3.8 จึงอาจถูกเขียนได้เป็น

$$x = x_0 2^{t/t_d} \qquad 3.10$$

ถ้าใส่ลอกฐาน 2 ลงในสมการที่ 3.10 จะได้ว่า

$$\log_2 x = \log_2 x_0 + t/t_d \qquad 3.11$$

ถ้าเขียนกราฟของ $\log_2 x$ กับเวลา t จะได้กราฟเส้นตรงโดยมีค่าความลาดเอียง (slope) เท่ากับ $1/t_d$ ซึ่งก็คือส่วนกลับของระยะเวลาในการทวีคูณหรือระยะเวลาชั่วอายุ ในงานบางอย่างก็นิยมใช้ส่วนกลับของระยะเวลาในการทวีคูณ $1/t_d$ แสดงถึงอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตมากกว่าใช้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะ μ

3.3 ความเหมาะสมของกฎการเจริญเติบโตแบบขยาย (VALIDITY OF EXPONENTIAL GROWTH LAW)

เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมคงที่และมีส่วนประกอบหรือร่างกายของชีวมวลคงที่ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะเป็นไปตามกฎการเจริญเติบโตแบบขยายตัวคงที่ดังนั้นจึงสามารถใช้สูตรหรือสมการต่าง ๆ ในหัวข้อ 3.2 ได้แต่ถ้าการเจริญเติบโตไม่เป็นไปตามกฎดังกล่าวข้างต้นก็อาจจะกล่าวได้ว่ามีสภาวะไม่อย่างใดก็อย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่างดังกล่าวนั้นไม่เหมาะสมหรือไม่คงที่ ได้เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าเชื้อแบคทีเรียและยีสต์มีระยะการเจริญเติบโตแบบขยาย (exponential growth phase) ซึ่งอาจถูกทำให้คงที่ได้จึงเป็นไปตามกฎดังกล่าวและกฎนี้ยังใช้ได้กับจุลินทรีย์พวกโปรคาริโอต (Procaryote) และยูคาริโอต (eucaryote) โดยทั่วไปเมื่อสภาวะทั้งสองอย่างดังกล่าวข้างต้นนั้นคงที่ กฎนี้ได้เคยถูกแสดงให้เห็นว่าใช้ได้กับการเพาะเลี้ยงเชื้อโปรโตซัว (Phelps, 1936) และเซลเนื้อเยื่อของสัตว์ชั้นสูงที่นำมาเพาะเลี้ยงไว้นอกร่างกาย (Birch & Pirt, 1970) กฎการเจริญเติบโตแบบขยายยังไม่อาจใช้ได้อย่างเหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อราถึงแม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อจมที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกันกับอาหาร (homogeneous submerged culture) และมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้คงที่ (Pirt & Callow, 1960) การเจริญเติบโตของฟังไจ (fungi) ที่เป็นเส้นสายมักแสดงความแตกต่างไปจากการเจริญเติบโตแบบขยาย ทั้งนี้อาจเนื่องจากฟังไจที่เป็นเส้นสายมีการเจริญเติบโตแบบที่จับตัวเป็นกลุ่มก้อนทำให้ชีวมวลไม่กระจายตัวเป็นอันหนึ่งอันเดียวกันกับอาหารและแก๊สออกซิเจนซึ่งต้องให้แก่เชื้อราจึงกลายเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต (growth-limiting) ปัญหาใหญ่ในการรักษาไว้ให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตแบบขยายตัวคงที่คือ การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมมักเกิดขึ้นได้ไม่ช้า

ก็เร็วอย่างหลีกเลี่ยงไม่พ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะเก็บกักโดยไม่มีการถ่ายเทอาหารอย่างสม่ำเสมอ(batch culture) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงใด ๆ ของสิ่งแวดล้อมมักกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงในร่างกายของชีวมวลตามติดต่อมาด้วย จากแบบอย่างการเจริญเติบโตของชีวมวลอย่างง่ายชี้แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมทำให้สัดส่วนต่าง ๆ ขององค์ประกอบในชีวมวลถูกปรับปรุงเปลี่ยนแปลงตามไปด้วยโดยอัตโนมัติเพื่อรักษาไว้ให้มีอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่าที่จะทำได้

3.4 พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต (GROWTH YIELD)

พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตถูกกำหนดให้เป็นผลลัพธ์ที่ได้จากการหารดังสมการ คือ

$$\Delta x/\Delta s = Y \qquad 3.12$$

Δx คือการเพิ่มจำนวนของชีวมวลทั้งหมดที่เกิดขึ้นเนื่องจากการใช้ซับสเตรตทั้งหมดจำนวน Δs ในการคิดคำนวนหาพืชผลการเจริญเติบโตที่ละเอียดกว่านี้อาจทำได้โดยคิดคำนวน $\Delta x/\Delta s$ ในช่วงแคบ ๆ ตามหลักวิชาแคลคูลัสในขณะที่ Δs มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ ($\Delta s \rightarrow 0$) นั่นคือ

$$Y = dx/ds \qquad 3.13$$

เป็นที่น่าสังเกตุว่าถ้า x และ s คือความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรตตามลำดับแล้ว $Y = -dx/ds$ เครื่องหมายลบถูกใส่ไว้เนื่องจาก x และ s มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางตรงข้ามกันคือ ถ้า x เพิ่มขึ้น s จะลดลงเพราะ s ถูกนำไปใช้ในการสร้าง x

พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตมีความสำคัญในแง่เป็นสื่อความหมายแสดงถึงปริมาณความต้องการสารอาหารของจุลินทรีย์ พืชผลการเจริญเติบโตถูกใช้แสดงถึงความต้องการสารอาหารของพังไจแล้วต่อมาจึงหันไปนิยมใช้ส่วนกลับของ Y เรียกว่า economic coefficient($1/Y$) ในกรณีของเชื้อแบคทีเรียเมื่อมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้คงที่จะพบว่าพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก็คงที่ด้วยเช่นเดียวกัน

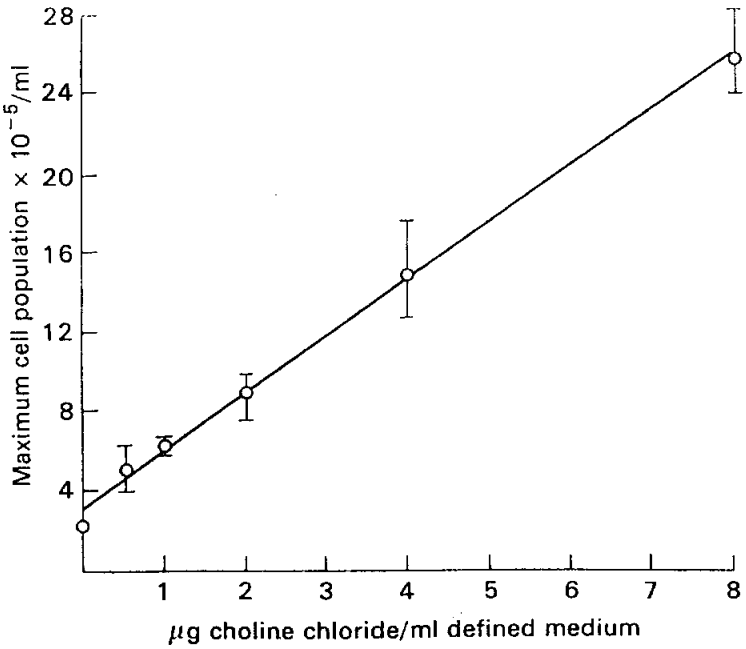
ด้วย ดังนั้นถ้าให้ x_0 และ s_0 เป็นความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรตเริ่มต้นตามลำดับ และ x และ s คือความเข้มข้นของชีวมวลและซับสเตรตที่ขณะที่ใดขณะหนึ่งในการหมักหรือการเพาะเลี้ยงจะได้ว่า

$$x - x_0 = Y(s_0 - s) \qquad 3.14$$

ในกรณีที่การเจริญเติบโตถูกกำหนดจำกัดด้วยซับสเตรต เมื่อเชื้อมีชีวมวลถึงจุดสูงสุดแล้ว (x_m) s จะมีค่าใกล้เคียงกับศูนย์ ($s \approx 0$) จึงเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$x_m - x_0 = Ys_0 \qquad 3.15$$

ดังนั้นสำหรับการเจริญเติบโตที่ถูกกำหนดจำกัดด้วยซับสเตรตถ้าลากเส้นกราฟระหว่างค่าของ x_m กับ s_0 จะได้กราฟเส้นตรงโดยมีความลาดเอียง Y รูปที่ 3.1 เป็นตัวอย่างแสดงถึงการใช้ความสัมพันธ์ระหว่าง x_m กับ s_0 เพื่อตรวจสอบพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของเซลล์สัตว์(หนู) ที่เพาะเลี้ยงไว้โดยใช้โคลีนเป็นซับสเตรตกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต (growth-limiting substrate)



รูปที่ 3.1 The effect of choline concentration on the growth of mouse LS cells in culture. The points on the graph are the mean values; vertical lines represent the ranges of the results. (From Birch & Pirt, 1969)

3.5 ผลหารการเมตาโบลิซึ่ม (METABOLIC QUOTIENT)

อัตราการใช้หรือบริโภคซับสเตรทของเชื้อจุลินทรีย์ที่ขณะใดขณะหนึ่งในการหมักหรือเพาะเลี้ยงอาจเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$ds/dt = qx \qquad 3.16$$

x คือชีวมวลที่ขณะใดขณะหนึ่ง และสัมประสิทธิ q คือผลหารการเมตาโบลิซึ่มหรืออัตราความเร็วในการเมตาโบลิซึ่มเฉพาะ (specific metabolic rate) ที่รู้จักกันดี คือ q_{O_2} และ $q_{glucose}$ สำหรับการบริโภคออกซิเจนและกลูโคสตามลำดับ ผลหารการเมตาโบลิซึ่มก็คล้ายคลึงกันกับกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ถ้าร่างกายของชีวมวลคงที่และสภาพแวดล้อมคงที่ก็ได้ผลหารการเมตาโบลิซึ่ม q คงที่ด้วย

จากสมการที่ 3.1 และ 3.13 อาจเขียนเป็นสมการสำหรับซับสเตรทที่ถูกใช้หรือถูกบริโภคเพื่อการเจริญเติบโตในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ (dt) ได้คือ

$$ds = \frac{\mu x}{Y} \cdot dt \qquad 3.17$$

ดังนั้น

$$ds/dt = \mu x/Y \qquad 3.18$$

เมื่อเปรียบเทียบสมการที่ 3.18 กับสมการที่ 3.16 จะได้ว่า

$$q = \mu/Y \qquad 3.19$$

สมการที่ 3.19 ถูกใช้เพื่อประเมินความต้องการซับสเตรท (โดยเฉพาะออกซิเจน) ที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน

การใช้ผลหารการเมตาโบลิซึ่มเพื่อแสดงถึงอัตราความเร็วในการเกิดผลิตผล (product) จะได้พิจารณากันในบทที่ 16

3.6 ผลกระทบเนื่องจากความเข้มข้นซับสเตรตต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโต

เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในสื่อกลางอาหารเหลวไม่ถ่ายเท (batch culture) มักปรากฏว่าเชื้อจุลินทรีย์มีช่วงระยะเวลาหนึ่งเป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตแบบขยายตัวคงที่(constant exponential growth) จึงทำให้ดูเสมือนว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ไม่ได้รับผลสะท้อนจากความเข้มข้นของซับสเตรตด้วยช่วงซึ่งกว้างมาก นั่นก็คือขบวนการเจริญเติบโตแสดงการเคลื่อนไหวในลำดับปฏิกริยาที่ศูนย์ (Zero order kinetics) แต่เนื่องจากการใช้ซับสเตรตของเซลล์ควรเป็นไปตามธรรมชาติแห่งการเคลื่อนไหวของเอนไซม์ (enzyme kinetics) ดังนั้นถ้าให้ s เป็นความเข้มข้นของซับสเตรตและ q เป็นผลหารการเมตาโบลิซึ่มจะได้สมการแบบเดียวกันกับ Michaelis-Menten equation ดังได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 คือ

$$q = q_m s/(s+K_s) \qquad 3.20$$

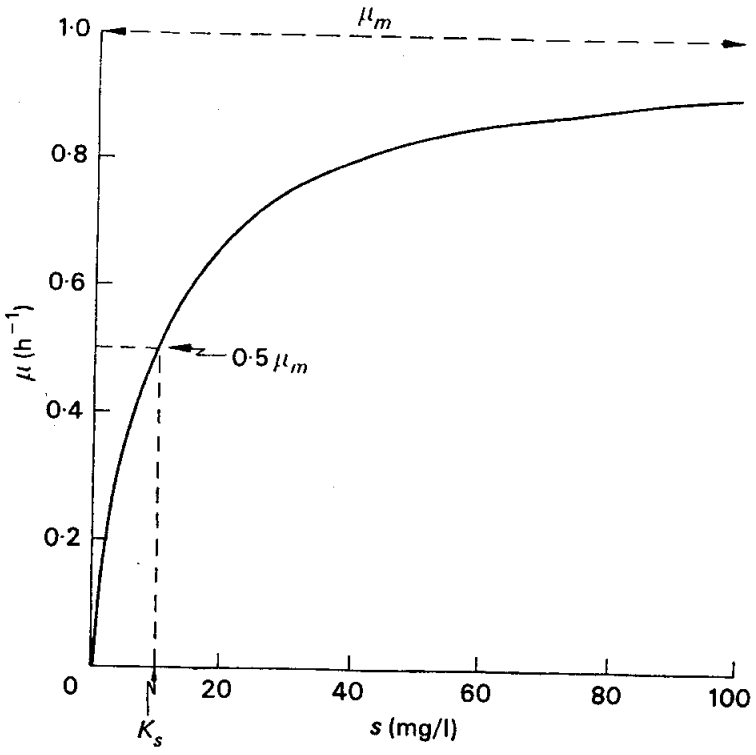
K_s ถูกเรียกว่าค่าความอิ่มตัวคงที่ (saturation constant) ซึ่งก็คล้ายกันกับ Michaelis-Menten constant และ q_m ก็คือค่าสูงสุดของ q ที่ได้เมื่อ $s \gg K_s$ ถ้าแทนค่า $q=\mu/Y$ และ $q_m=\mu_m/Y$ จะได้สมการเป็น

$$\mu = \mu_m s/(s+K_s) \qquad 3.21$$

สมการที่ 3.21 มักถูกเรียกว่า Monod equation เนื่องจาก Monod (1942) เป็นบุคคลแรกที่ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกันระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกับความเข้มข้นของซับสเตรต ดังรูปที่ 3.2

K_s เป็นค่าซึ่งผกผันสำหรับความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ต่อซับสเตรต ถ้าจัดเรียงสมการที่ 3.21 เสียใหม่โดยกลับเศษส่วนทั้งสองข้างจะได้สมการหน่วงเดียวกันกับ Lineweaver-Burk equation ดังได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 คือ

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{s\mu_m} + \frac{1}{\mu_m} \qquad 3.22$$



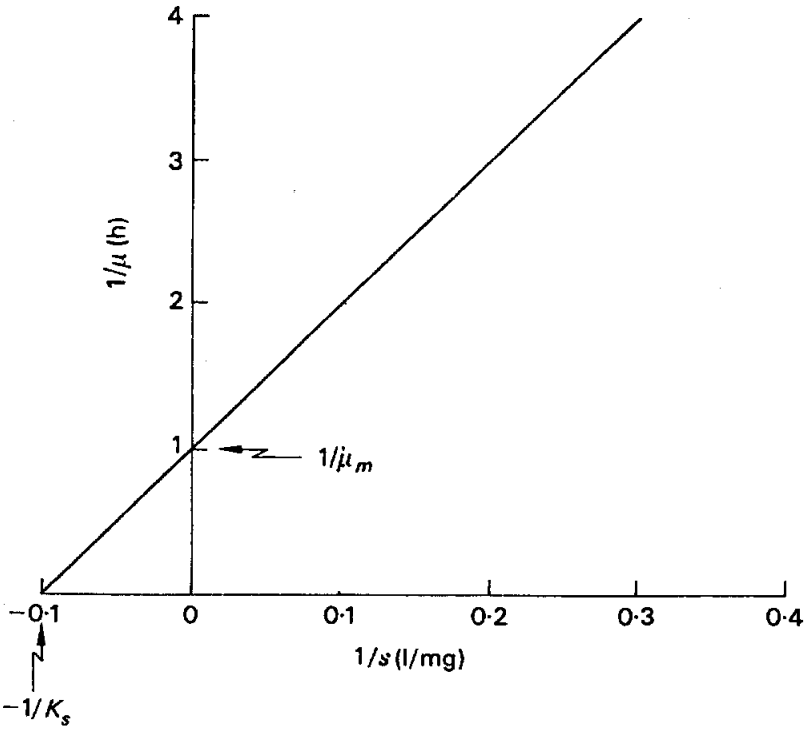
รูปที่ 3.2 Specific growth rate (μ) plotted as a function of substrate concentration (s) according to the Monod equation $\mu=\mu_m s/(s+K_s)$ where $\mu_m=1{\cdot}0\ h^{-1}$ and $K_s=10$ mg/l. Note, When $s=K_s$, $\mu=0{\cdot}5\mu_m$

ดังนั้นถ้าลากเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/\mu$ กับ $1/s$ จะได้เส้นตรงโดยมีจุดตัดบนแกน $1/\mu$ ที่ $1/\mu_m$ และจุดตัดบนแกน $1/s$ ที่ $-1/K_s$ ดังรูปที่ 3.3 กราฟเส้นตรงที่ได้จากการกลับเศษส่วนทั้งสองข้างของสมการ(double reciprocal plot) เช่นนี้ช่วยให้สดวกในการตรวจสอบความถูกต้องสมบูรณ์ของความสัมพันธ์ฉันแบบเส้นโค้งดังในรูปที่ 3.2

3.7 ค่าความอิ่มตัวคงที่

(SATURATION CONSTANT, K_s)

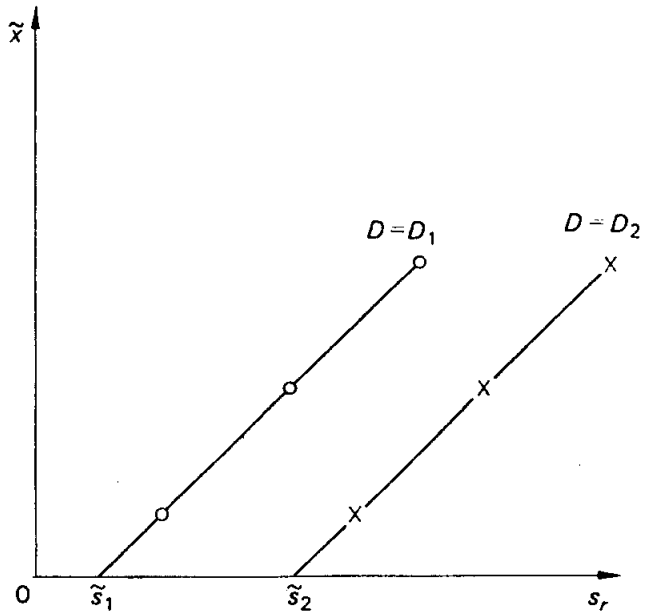
ค่าของ K_s ได้รับการตรวจสอบไม่บ่อยนักเนื่องจากมีค่าค่อนข้างต่ำมาก และมักต่ำกว่าปริมาณที่จะตรวจสอบได้โดยวิธีทางเคมี อีกทั้งในขณะที่นำเอาตัวอย่าง



รูปที่ 3.3 Reciprocal plot of data for Fig. 3.2.

ออกมาทดสอบปริมาณของซับสเตรตจะลดลง เป็นลำดับก่อนทำการทดสอบวิธีการซึ่งใช้ในการหาค่าของ s ที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่าง ๆ กันอาจทำได้ดังต่อไปนี้ (1) วัดปริมาณของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต (growth-limiting substrate) เช่น แกสออกซิเจนในการหมักหรือเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบคงที่ทางเคมี (chemostat culture) ที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่าง ๆ กัน (Johnson, 1967) (2) วัดอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของซับสเตรตในการหมักหรือเพาะเลี้ยงแบบไม่ถ่ายเหหรือเก็บกัก (batch culture) (3) วัดอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเมื่อสิ้นสุดการหมักหรือเพาะเลี้ยงแบบไม่ถ่ายเหหรือเก็บกัก (Monod, 1942) และประเมินหาค่าความเข้มข้นของซับสเตรตจากชีวมวลได้โดยใช้สมการที่ 3.14 (4) วัดหาค่าอัตราความเร็วในการเจือจางวิกฤต

(critical dilution rate) จากการหมักหรือเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบคงที่ ทางเคมีด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ของซับสเตรตที่กำหนดการเจริญเติบโตในอาหารที่เติมเข้าไป (feed medium)(Dean Rogers,1967) (5) โดยวิธีการทำให้เกิดสถานะมั่นคง (steady state)ตามแบบฉบับของ Button (1969) ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 Method of Button (1969) to determine the concentration of growth-limiting substrate ($\tilde{s}$) at a given specific growth rate ($\mu = D$) in a chemostat. Each straight line is a plot of the steady-state biomass ($\tilde{x}$) at a given dilution rate with different concentrations (s_r) of growth-limiting substrate in the feed medium. The straight line is represented by $\tilde{x} = Y(s_r - \tilde{s})$ where Y is the growth yield. On extrapolation of the line to $\tilde{x} = 0$ we have $s_r = \tilde{s}$.

ตารางที่ 3.1 Saturation constants (K_s values) for growth of organisms on diverse substrates

Organism (genus)	Substrate	K_s (mg/l)	K_s (10^{-5} M)	Reference
Escherichia	glucose	$6{\cdot}8 \times 10^{-2}$	$3{\cdot}8 \times 10^{-2}$	Shehata & Marr (1971)†
Unknown bacteria	phenol	$9{\cdot}0 \times 10^{-1}$	1·0	Jones *et al.* (1973)
Escherichia	mannitol	2·0	1·1	Monod (1942)
Escherichia	glucose	4·0	2·2	Monod (1942)
Aspergillus	glucose	5·0	2·8	Pirt (1973)
Candida	glycerol	4·5	4·9	Button & Garver (1966)
Tetrahymena	bacteria	12·0		Curds (1971)
Escherichia	lactose	20·0	5·9	Monod (1942)
Saccharomyces	glucose	25·0	14·0	Pirt & Kurowski (1970)
Pseudomonas	methanol	0·7	2·0	Harrison (1973)
Pseudomonas	methane	0·4	2·6	Harrison (1973)
Klebsiella	carbon dioxide	0·4	9×10^{-1}	Section 8.8
Escherichia	phosphate ions	1·6	1·7	Shehata & Marr (1971)†
Klebsiella	magnesium ions	$5{\cdot}6 \times 10^{-1}$	2·3	Dean & Rogers (1967)
Klebsiella	potassium ions	$3{\cdot}9 \times 10^{-1}$	1·0	Dean & Rogers (1967)
Klebsiella	sulphate ions	2·7	$2{\cdot}8 \times 10^{-1}$	Dean & Rogers (1967)
Candida	oxygen	$4{\cdot}5 \times 10^{-1}$	1·4	Button & Garver (1966)
Candida	oxygen	$4{\cdot}2 \times 10^{-2}$	$1{\cdot}3 \times 10^{-1}$	Johnson (1967)
*Aspergillus**	arginine	$5{\cdot}0 \times 10^{-1}$	$2{\cdot}9 \times 10^{-1}$	Pirt (1973)
*Escherichia**	tryptophan	$1{\cdot}1 \times 10^{-3}$	$5{\cdot}4 \times 10^{-3}$	Novick (1958)
*Escherichia**	tryptophan	$4{\cdot}9 \times 10^{-4}$	$3{\cdot}4 \times 10^{-3}$	Shehata & Marr (1971)
Cryptococcus	thiamine	$1{\cdot}4 \times 10^{-7}$	$4{\cdot}7 \times 10^{-10}$	Button (1969)

* Amino acid auxotroph

† The lower of the two values found

ตารางที่ 3.1 แสดงให้เห็นว่าค่า K_s สำหรับแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนโดยทั่วไปจะอยู่ประมาณ 10^{-5} ม. ค่า K_s สำหรับฟอสเฟต โปแตสเซี่ยมและแมกนีเซี่ยมไอออนจะอยู่ประมาณ 10^{-5} ม และค่า K_s สำหรับออกซิเจนจะอยู่ในช่วงระหว่าง 10^{-6} ถึง 10^{-5} ม ค่า K_s สำหรับกรดอะมิโนและวิตามินต่าง ๆ มักต่ำกว่า 10^{-5} ม ไปหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งลำดับของเลขชี้กำลังคือ 10^{-6} หรือต่ำกว่า 10^{-6} ลงไป ไม่มีค่า K_s สำหรับแร่ธาตุชนิดย่อย(trace element) ที่อาจตรวจสอบได้อย่างถูกต้อง ค่า K_s สำหรับเซลล์พวกโปรคาริโอต(procaryote)และยูคาริโอต(eucaryote) มักอยู่ในลำดับของเลขชี้กำลัง(order of magnitude) เดียวกัน สำหรับแป้งซึ่งเป็นโพลีเมอร์ขนาดใหญ่ก็มีค่า K_s สำหรับ K. aerogenes บนพื้นฐานความเข้มข้นเป็นโมลา(molar) ใกล้เคียงกันกับ K_s สำหรับโมโนเมอร์ (monomer) (Hernandea & Pirt, 1975) เซลล์แบคทีเรียที่ใช้เป็นซับสเตรตของโปรโตซัว Tetrahymena ดังในตารางที่ 3.1 ก็มีค่า K_s บนพื้นฐานของน้ำหนักเปรียบเทียบได้กับสารประกอบโมเลกุลเล็กที่ละลายน้ำได้

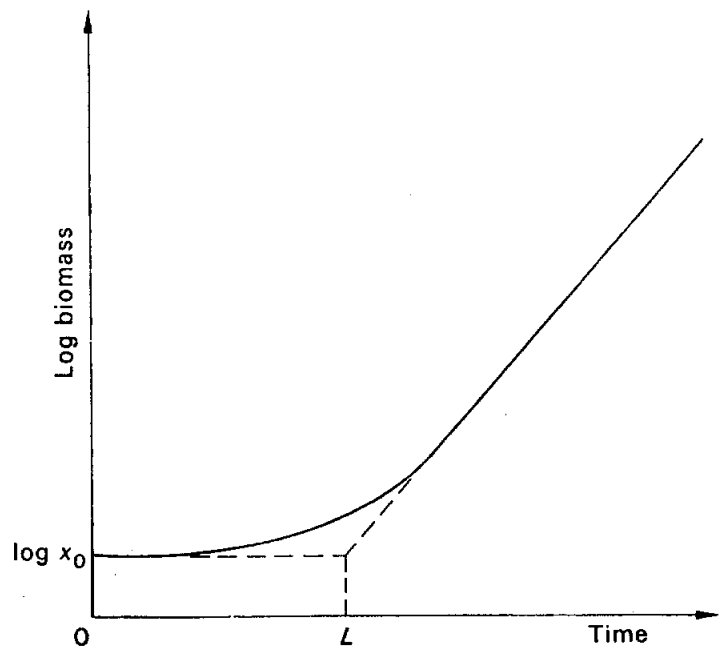
โดยทั่วไปผลที่ได้จากการตรวจสอบหาค่า K_s มักเป็นไปตามความสัมพันธ์แบบ Monod ดังในสมการที่ 3.21 อย่างไรก็ตาม Shehata และ Marr (1971) ได้พบการเบี่ยงเบนไปจากความสัมพันธ์แบบ Monod เมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงขึ้น และชี้ให้เห็นว่าความยุ่งยากของจุลินทรีย์ต่อซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไปตามอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต

3.8 ความหมายของระยะล้าหลังก่อนการเจริญเติบโต (DEFINITION OF THE LAG PERIOD BEFORE GROWTH)

เนื่องจากในการหมักหรือการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มักมีการล้าหลัง (lag) เกิดขึ้นก่อนที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะของชีวมวลจะถึงจุดสูงสุดของตน ระยะเวลาในการล้าหลัง (L) นี้อาจถูกกำหนดได้โดยวิธีการอย่างง่ายของ Lodge และ Hinshelwood (1943) โดยการเขียนเส้นกราฟลอกจำนวนของชีวมวลกับเวลาซึ่งจะได้

เส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 3.5 แล้วลากเส้นต่อออกมาจนถึงระดับชีวมวลเริ่มต้นและจุดตัดบนเส้นแกนของเวลาดังรูปที่ 3.5 ถือว่าเป็น L ดังนั้นการเจริญเติบโตของเชื้อในกรณีนี้จึงเปลี่ยนไปจากสมการที่ 3.3 คือ

$$\ln x = \mu(t-L)+\ln x_0 \qquad 3.23$$



รูปที่ 3.5 Definition of lag period, L.

3.9 ขอบเขตจำกัดสำหรับความเข้มข้นสูงสุดของชีวมวล (LIMITS TO MAXIMUM BIOMASS CONCENTRATION)

ความหนาแน่นสูงสุดของชีวมวลที่อาจเกิดขึ้นได้ในสื่อกลางอาหารหนึ่งถูกกำหนดจำกัดโดยสภาวะใดสภาวะหนึ่งในสี่สภาวะดังต่อไปนี้ (1) ปริมาณของซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโต (2) การสะสมตัวของสารยับยั้ง (3) ความหนาแน่นสูงสุดในการอัดตัวของชีวมวล (4) การตายของเซลล์ Bail(1929) ได้เสนอว่าความหนาแน่นสูงสุดของแบคทีเรียหรือเรียกว่า "M" concentrationในสื่อกลางใดสื่อกลางหนึ่งนั้นถูกกำหนดจำกัดโดยความต้องการสำหรับเนื้อที่ว่างทางชีววิทยา(biological space) ความคิดซึ่งคลุมเครือเช่นนี้แสดงนัยว่าเนื้อที่ว่าง เปล่าทางชีววิทยานั้นกว้างขวางกว่าเนื้อที่ว่าง เปล่าทางกายภาพที่ถูกครอบครองโดยสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามเป็นที่ประจักษ์ชัดแล้วว่า "M" concentration ซึ่งถูกเสนอโดย Bail อาจถือได้ว่าเป็นสิ่งกำหนดทั้งในแง่ความจำกัดทางสารอาหาร (nutrient) โดยเฉพาะแก๊สออกซิเจนและสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสื่อกลางต่าง ๆ ความคิดของ Bail เป็นประวัติความสนใจที่เกิดขึ้นตั้งแต่ได้เริ่มมีความไม่แน่ใจเกี่ยวกับเรื่องนี้เกิดขึ้นในท่ามกลางหมู่นักแบคทีเรียวิทยาเป็นเวลาหลายปีและสิ่งที่คล้ายคลึงกันซึ่งอาจมองเห็นได้เกี่ยวกับเรื่องนี้คือข้อคิดจากการสัมผัสยับยั้ง (contact inhibition) ในการเจริญเติบโตของเซลล์จากเนื้อเยื่อสัตว์ชั้นสูงที่เพาะเลี้ยงไว้นอกร่างกาย แต่การเจริญเติบโตของเซลล์สัตว์ชั้นสูงซึ่งกล่าวกันว่าตกอยู่ภายใต้อิทธิพลของการสัมผัสยับยั้งกลับถูกพบว่ามีการเจริญเติบโตเป็นเนื้อเยื่อหลายชั้นได้โดยไม่จำกัดเมื่อมีสารอาหารเพิ่มเติมให้อย่างต่อเนื่องอยู่ตลอดเวลา (Kruse Miedena, 1965) อีกทั้งยังมีเซลล์พวกอื่นที่กล่าวกันว่าการเจริญเติบโตถูกทำให้หยุดลงได้โดยการสัมผัสก็ถูกพบว่าการยับยั้งนั้นเป็นผลเนื่องมาจากมีกรดเกิดขึ้น (Ceccarina Eagle, 1971) ดังนั้นความคิดที่ว่าการสัมผัสกันระหว่างเซลล์สัตว์เป็นสิ่งยับยั้งการเจริญเติบโตจึงได้ถูกลบล้างไป

ในกรณีที่ไม่มีการยับยั้งและประชากรยังคงมีชีวิตอยู่ถ้ามีการให้อาหารโดยไม่จำกัดซึ่งอาจได้รับจากการแพร่กระจายผ่านเยื่อกึ่งซึม (Semi-perneable membrane) เข้ามาสิ่งเดียวที่อาจกำหนดจำกัดความเข้มข้นของชีวมวลได้คือ ความหนาแน่นสูงสุดในการ

อัดตัวของจุลินทรีย์หรือเซลล์ในชีวมวล สถานะภาพสุดท้ายเช่นนี้จะพบเห็นได้ในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ ความหนาแน่นสูงสุดในการอัดตัวของเซลล์ (จำนวน/ซม.^{3}) ถูกกำหนดได้โดยสูตร $10^{12}/v$ ซึ่ง v ก็คือปริมาตรของเซลล์หนึ่งเซลล์มีหน่วยเป็น "ไมโครมีเตอร์^{3}" (μm^3) และ 1 ซม.^{3} เท่ากับ 10^{12} ไมโครมีเตอร์^{3} ความหนาแน่นสูงสุดในการอัดตัวที่คำนวนได้จากสูตรนี้สำหรับจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.2 ความหนาแน่นสูงสุดของประชากรที่อาจเป็นไปได้นี้ตรงกันกับน้ำหนักแห้งประมาณ 10% (w/v)

ตารางที่ 3.2 Maximum packing densities* of some microorganisms in number per cm^3

Organism	Shape assumed	Radius (μm)	Length (μm	v(μm^3)	Maximum (number/cm^3)
Serratia marcescens†	rod	0·5	1·7	1·34	$7·5 \times 10^{11}$
Klebsiella aerogenes†	rod	0·86	5·4	12·5	$8·0 \times 10^{10}$
Bacillus megaterium†	rod	1·2	7·6	34·4	$2·9 \times 10^{10}$
Saccharomyces cerevisiae	sphere	3·5	—	179	$5·6 \times 10^{9}$
Mouse L cells	sphere	10·0	—	4190	$2·4 \times 10^{8}$

* Calculated from the formula, $10^{12}/v$, where v = cell volume in μm^3

† Dimensions from Powell (1963)