บทที่ 8
แหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนในการหมัก

8.1 คำนำ

ฟังไจ โปรโตซัวและแบคทีเรียหมู่ใหญ่เป็นพวกฮีทีโรโทรฟิก(heterotrophic) ได้รับธาตุคาร์บอนจากสารอินทรีย์ ส่วนโปรคิสท์ที่เหลืออยู่ประกอบด้วยสาหร่ายและแบคทีเรียบางหมู่ซึ่งได้รับธาตุคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์และถูกเรียกว่าพวกออโตโทรฟิก (autotrophic) สิ่งมีชีวิตต้องการแหล่งพลังงานเพื่อสังเคราะห์สารเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตและสำหรับการทำนุบำรุง การจัดแบ่งหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตตามความต้องการพลังงานและธาตุคาร์บอนโดย Stanier และคณะ (1963) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8.1 ความต้องการพลังงานแสงของโปรคิสท์ที่สังเคราะห์แสง(phatosynthetic protists) ไม่ได้นำมาพิจารณาในที่นี้

ตารางที่ 8.1 Classification of energy sources and electron donors and acceptors for protists

Type of organism	Energy source	Electron acceptors in energy-yielding process	Electron donors in energy-yielding process or for CO_2 reduction
Photolithotrophic	light	—	water, reduced sulphur compounds
Photoorganotrophic	light	—	organic compounds
Chemolithotrophic	oxidation–reduction	oxygen, carbon dioxide	inorganic (hydrogen, reduced sulphur, reduced nitrogen, ferrous ions)
Chemoorganotrophic	oxidation–reduction	oxygen, nitrate, sulphate, organic compounds	organic compounds

ออกซิเจนเป็นสารออกซิแด้นท์ (oxidant) ซึ่งสามัญที่สุดอย่างหนึ่งในขบวนการเมตาโบลิซึ่มเพื่อให้ได้พลังงาน แต่ในสภาพที่ขาดออกซิเจนแบคทีเรียบางชนิดก็สามารถใช้ไนเตรตหรือซัลเฟตไอออนเป็นสิ่งรับอีเล็คตรอนได้ พวก Chemolithotroph

มีการออกซิไดซ์สารอนินทรีย์ไนโตรเจนและกำมะถันซึ่งอยู่ในรูปรีดิวซ์หรือเฟอร์รัสไอออน หรือไฮโดรเจนเพื่อให้ได้รับพลังงานภายใต้สภาพที่มีแกสออกซิเจน ส่วนพวก methanogenic bacteria เป็นพวก anaerobic autotroph ซึ่งใช้ไฮโดรเจนในการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ทำให้เกิดแกสมีเทนและได้รับพลังงาน สำหรับโปรคิสท์พวกอื่นโดยเฉพาะในหมู่ของแบคทีเรียและยีสท์ได้รับพลังงานภายใต้สภาพที่ปราศจากแกสออกซิเจนโดยปฏิกริยาออกซิเดชั่นรีดักชั่นของสารอินทรีย์ ขบวนการเช่นนี้ถูกเรียกตามทฤษฎีว่าขบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งแตกต่างจากความหมายของขบวนการหมักในเชิงปฏิบัติและอุตสาหกรรม

ความต้องการแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนในปริมาณที่แน่นอนจำเป็นต้องทราบถึงค่า K_s และพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต (growth yield) จากซับสเตรทตารางที่ 3.1 แสดงว่าค่า K_s สำหรับคาร์บอนและแหล่งพลังงานจะอยู่ที่ประมาณ 10^{-5} M ซึ่งสูงที่สุดสำหรับสารอาหารต่าง ๆ ค่า K_s สำหรับฟอสเฟต โปแตสเซี่ยม หรือแมกนีเซี่ยมไอออนเท่านั้นที่อยู่ในระดับเดียวกัน

ค่าซึ่งเป็นตัวแทนสำหรับพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตทั้งหมดจากแหล่งธาตุคาร์บอนและพลังงานถูกให้ไว้ในตารางที่ 8.2 พืชผลหรือประสิทธิภาพทั้งหมดนี้หมายรวมถึงความต้องการสำหรับเซลล์คาร์บอน พลังงานเพื่อการเจริญเติบโตและพลังงานเพื่อการทำนุบำรุง จะเห็นได้ว่าพืชผลหรือประสิทธิภาพทั้งหมดบนพื้นฐานของธาตุคาร์บอนนั้นค่อนข้างคงที่คือเปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่ 0.09 ถึง 1.34 เท่านั้น ดังนั้นจึงมีค่าที่ทำนายได้บางส่วนสำหรับพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต

พลังงานในขั้นสุดท้ายจะถูกจัดเตรียมให้อยู่ในรูปของ ATP ดังนั้นจึงมักถือว่า ATP เป็นกระแสเงินตราสำหรับพลังงานของเซลล์ซึ่งถูกใช้เพื่อทำให้เกิดขบวนการทุกอย่างที่ต้องการพลังงาน

ตารางที่ 8.2 Overall growth yields from various carbon and energy sources

Organism	Substrate	Maximum observed growth yield (g dry weight/g)		
		Substrate	Substrate carbon	Oxygen used
Candida utilis[1]	glucose	0·51	1·28	1·30
Penicillium chrysogenum[2]	glucose	0·43	1·08	1·35
Aerobacter cloacae[3]	glucose	0·44	1·10	1·03
Candida utilis[1]	acetic acid	0·36	0·90	0·62
Candida utilis[1]	ethanol	0·68	1·30	0·58
Pseudomonas sp.[5]	methanol	0·41	1·09	0·44
Bacterial sp.[6]	*n*-pentane	0·84	1·01	0·44
Candida intermedia[1]	*n*-alkanes (C_{16}–C_{22})	0·81	0·96	0·35
Methylococcus sp.[4]	methane	1·01	1·34	0·29

[1]Johnson (1967a), [2]Pirt & Callow (1960), [3]Pirt (1957), [4]Harwood & Pirt (1972), [5]Harrison *et al.* (1972), [6]Takahashi *et al.* (1970)

8.2 การใช้ธาตุคาร์บอน

เมื่อซับสเตรตอย่างหนึ่งทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งของธาตุคาร์บอนและพลังงานสำหรับสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบอย่างแน่นอนว่ากี่ส่วนของสารประกอบคาร์บอนนั้นถูกใช้ไปเป็นองค์ประกอบของเซลล์หรือร่างกาย(assimilation) และกี่ส่วนถูกทำลายไป (dissimilation) เพื่อให้ได้รับพลังงานนั้นเป็นเรื่องซึ่งยุ่งยากมากอย่างไรก็ตามการตรวจสอบก็สามารถทำได้โดยวิธีใดวิธีหนึ่งหรือหลายวิธีในสี่วิธีการดังต่อไปนี้

วิธีการแรกตั้งอยู่บนพื้นฐานของการติดป้ายหรือเครื่องหมาย(label)ของซับสเตรตคาร์บอนด้วย ^{14}C แล้วตรวจสอบปริมาณของเครื่องหมายที่ปรากฏอยู่ในเซลล์คาร์บอน วิธีการนี้ถูกใช้กับ *Streptococcus faecalis* โดย Bauchop & Eisden (1960) และกับยีสต์โดย Kormancikova และคณะ (1969)

ในวิธีการที่สองคาร์บอนซับสเตรตที่ถูกใช้เป็นองค์ประกอบของเซลล์ถูกตรวจสอบจากความสมดุลย์ คือ

total substrate utilized (ΔS)	=	substrate utilized to provide cell carbon (ΔS_c)	+	substrate utilized to provide energy (ΔS_E)	8.1

ถ้าหารความสมดุลย์ของซับสเตรตด้วย Δx ซึ่งเป็นปริมาณของชีวมวลที่เกิดขึ้นจะได้ว่า

$$\Delta S/\Delta x = \Delta S_c/\Delta x + \Delta S_E/\Delta x \qquad 8.2$$

จึงอาจเขียนได้ว่า

$$1/Y = 1/Y_c + 1/Y_E \qquad 8.3$$

ถ้า β คือสัดส่วนของชีวมวลที่เป็นธาตุคาร์บอนและ γ คือสัดส่วนของซับสเตรตที่เป็นธาตุคาร์บอนจะได้ว่า

$$\beta Y_c = \gamma \qquad 8.4$$

ใช้สมการที่ 8.4 เพื่อแทนค่าสำหรับ Y_c ในสมการที่ 8.3 แล้วจัดเรียงเสียใหม่จะได้ว่า

$$Y_E = \gamma Y/(\gamma - \beta Y) \qquad 8.5$$

วิธีการนี้ถูกใช้โดย Stouthamer & Bettenhausen (1973)

วิธีการที่สามถูกใช้สำหรับขบวนการซึ่งใช้แก๊สออกซิเจนเพื่อตรวจสอบค่าจากปริมาณสัมพันธ์(Stoichiometry) ของการใช้ออกซิเจนและการใช้ซับสเตรตเพื่อให้ได้รับพลังงาน วิธีการนี้ถือว่าออกซิเจนทั้งหมดถูกใช้เป็นสารรับอีเล็คตรอนในขั้นสุดท้ายของขบวนการสร้างพลังงาน(Hernandez & Johnson, 1967)การถือเช่นนี้อาจใช้ได้ไม่เสมอไปเนื่องจากในบางขบวนการออกซิเจนก็ไม่ได้ถูกใช้ในการรีดิวส์อย่างง่าย ๆ แต่ถูกใช้รวมเข้าไปเป็นส่วนหนึ่งในสารประกอบคาร์บอนโดยเอนไซม์ออกซิเจนเนส(Oxygenase) ตัวอย่างเช่นหนึ่งอะตอมของออกซิเจนต่อหนึ่งโมเลกุลของ n-paraffin ซึ่งสามารถทำให้ n-paraffin แตกตัวออกได้โดยการแทรกเข้าไปของออกซิเจนอะตอม

วิธีการที่สี่อาจถูกใช้เพื่อวัดปริมาณของซับสเตรตที่ถูกทำลายในการทำให้เกิดพลังงานโดยการวัดปริมาณของผลผลิตสุดท้ายในขบวนการเมตาโบลิซึ่มพลังงาน ตัวอย่างเช่นการเกิดกรดแลคติคจากน้ำตาลกลูโคสในขบวนการหมักกรดแลคติค อีทานอลจากน้ำตาลกลูโคสในขบวนการหมักของยีสต์ และการเกิดกรดอะซีติคจากอีทานอลโดย

อะซีติกแอสิดแบคทีเรีย การเปรียบเทียบอัตราส่วนของแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนที่ถูกใช้เป็นองค์ประกอบของเซลล์และถูกทำลายไปเพื่อให้ได้พลังงานได้แสดงไว้ในตารางที่ 8.3

ตารางที่ 8.3 Assimilated and dissimilated carbon and energy substrate

Organism	Conditions	Glucose carbon assimilated (%)	Glucose dissimilated to provide energy (%)
Streptococcus faecalis[1]	Rich medium, anaerobic	2	98
Saccharomyces cerevisiae[2]	Rich medium, anaerobic	2	98
Saccharomyces cerevisiae[2]	Rich medium, aerobic	10	90
Aerobacter cloacae[3]	Minimal medium, aerobic	55	45

[1]Bauchop & Elsden (1960), [2]Kormančičková *et al.* (1969), [3]Pirt (unpublished)

8.3 พลังงานเพื่อการทำนุบำรุง (MAINTENANCE ENERGY)

8.3.1 คำจำกัดความ

ได้มีสมมุติฐานมานานแล้วว่าจุลินทรีย์และเซลล์มีความต้องการพลังงานทั้งเพื่อการเจริญเติบโตและเพื่อที่เรียกกันว่าการทำนุบำรุง หน้าที่เกี่ยวกับการทำนุบำรุงเฉพาะที่ยอมรับกันคือ การถ่ายเทโยกย้ายเปลี่ยนแปลงสารเซลล์ งานเกี่ยวกับออสโมซิสเพื่อรักษาไว้ซึ่งความแตกต่างของความเข้มข้นระหว่างในเซลล์และนอกเซลล์ และการเคลื่อนไหวด้วยตนเองของเซลล์

พลังงานที่ใช้เพื่อการทำนุบำรุงถูกกำหนดได้ในวิถีทางดังต่อไปนี้ แหล่งพลังงานทั้งหมดที่ใช้ (ΔS_E) ถูกปันส่วนโดยสมมุติเป็นพลังงานเพื่อการเจริญเติบโต (ΔS_G) และพลังงานเพื่อการทำนุบำรุง (ΔS_M) นอกจากนี้ ATP ยังอาจถูกทำให้เกิดขึ้นหรือสูญเสียไปได้โดยการไฮโดรไลสิสที่ไม่ควบคู่กับการเจริญเติบโตหรือการทำหน้าที่เกี่ยวกับการทำนุบำรุง การสูญเสีย ATP เช่นนี้ปกติก็ไม่อาจแบ่งแยกให้แตกต่างไปได้จากพลังงานเพื่อการทำนุบำรุง

จึงเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$Y_E = \Delta x/\Delta S_E = \Delta x/(\Delta S_G + \Delta S_M) \qquad 8.6$$

Δx คือจำนวนหรือปริมาณของชีวมวลที่เกิดขึ้น เมื่อพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงเป็นศูนย์ คือ $\Delta S_M = 0$ จะได้ผลผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตที่แท้จริงซึ่งถูกกำหนดโดยสมการ

$$Y_{EG} = \Delta x/\Delta S_G \qquad 8.7$$

สิ่งนี้คือค่าสูงสุดที่อาจเป็นไปได้สำหรับผลผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากแหล่งพลังงาน สมมุติว่ามีชีวมวลจำนวนหนึ่งซึ่งกำหนดให้คือ x แหล่งพลังงานที่ถูกใช้ไปด้วยอัตราความเร็วคงที่เพื่อการทำนุบำรุงถูกกำหนดได้โดย $(ds/dt)_m = mx$ ซึ่ง m คือค่าคงที่เรียกว่าสัมประสิทธิการทำนุบำรุง (maintenance coefficient) ความสมดุลย์สำหรับแหล่งพลังงานที่ใช้ถูกกำหนดได้โดย

total rate of consumption = rate of consumption for growth + rate of consumption for maintenance

นั่นก็คือ

$$\mu x/Y_E = \mu x/Y_{EG} + mx \qquad 8.8$$

ดังนั้น

$$1/Y_E = 1/Y_{EG} + m/\mu \qquad 8.9$$

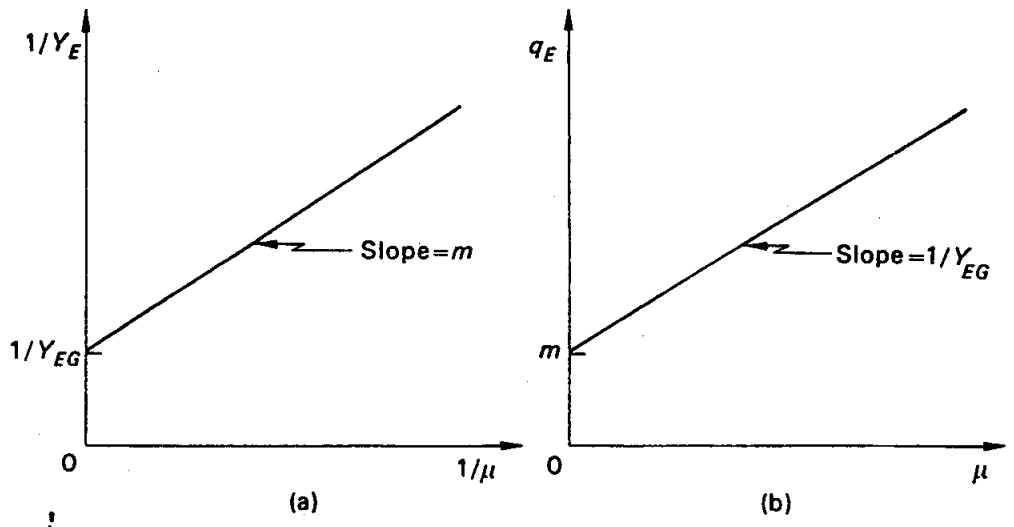
ในอีกทางหนึ่งยังอาจเขียนได้ว่า

$$q_E x = \mu x/Y_{EG} + mx \qquad 8.10$$

ซึ่ง q_E คืออัตราการเมตาโบลิซึมสำหรับแหล่งพลังงาน ดังนั้น

$$q_E = \mu/Y_{EG} + m \qquad 8.11$$

จากสมการที่ 8.9 จึงเป็นไปได้ว่าถ้า m คงที่ เส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าของ $1/Y_E$ กับ $1/\mu$ (รูปที่ 8.1 a) จะเป็นเส้นตรงด้วยความลาดเอียง m และมีจุดตัดที่ $1/Y_{EG}$ บนแกนตั้ง ในอีกทางหนึ่ง m อาจถูกตรวจสอบได้จากการเขียนเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าของ q_E กับ μ ดังรูปที่ 8.1b



รูปที่ 8.1 Graphical methods for the calculation of the maintenance coefficient (m) and the maximum growth yield ($1/Y_{EG}$) from plots of Eqn *8.10* and *8.12*.

จากการสังเกตุโดยทั่วไปพบว่า $1/Y_E$ และ $1/\mu$ มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง เมื่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปในการหมักแบบคงที่ทางเคมี (Stouthamer & Betthausen 1973) เส้นกราฟของสมการที่ 8.9 ได้ถูกสร้างขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Pirt (1965) พืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตรวมทั้งแหล่งขาตุคาร์บอนส่วนที่ถูกใช้เพื่อเปลี่ยนแปลงให้เป็นองค์ประกอบของเซลล์(assimilated carbon source) ก็คือเศษส่วนกลับของพืชผลการเจริญเติบโตที่เป็น $1/Y_E+1/Y_c$ ในสมการที่ 8.3 อย่างไรก็ตามสิ่งนี้ไม่มีผลต่อการคิดคำนวนหาค่า m

8.3.2 การทำนุบำรุงในแง่ซึ่งทำให้ชีวมวลหมดเปลืองไป

การให้เหตุผลสำหรับพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากแหล่งพลังงานซึ่งมักลดลงตามอัตราความเร็วในการเจริญเติบโต Herbert(1958) และ Marr กับคณะ (1963) ได้แทนค่าความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงเป็นการหมดเปลืองไปของชีวมวลโดยการเมตาโบลิซึ่มภายใน ดังนั้นจึงได้ว่า

net growth = total growth − biomass consumed endogenously

นั่นก็คือ

$$dx = \mu_T x.dt - ax.dt \qquad 8.12$$

ซึ่ง μ_T คืออัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะทั้งหมด และ a คือสิ่งที่เรียกกันว่าอัตราความเร็วในการทำนุบำรุงเฉพาะ (Specific maintenace rate) จากสมการที่ 8.12 จะเปลี่ยนรูปได้ว่า

$$dx/dt = (\mu_T - a)x \qquad 8.13$$

อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะที่ปรากฏถูกกำหนดได้โดย

$$\mu = \mu_T - a \qquad 8.14$$

สำหรับความสมดุลย์ของแหล่งพลังงานจะได้ว่า

$$\frac{\mu x.dt}{Y_E} = \frac{\mu_T x.dt}{Y_{EG}} \qquad 8.15$$

แทนค่า μ_T ในสมการที่ 8.15 จะได้ว่า

$$1/Y_E = 1/Y_{EG} + a/\mu Y_{EG} \qquad 8.16$$

เปรียบเทียบสมการที่ 8.9 และ 8.16 จะเห็นว่า

$$m = a/Y_{EG} \qquad 8.17$$

อัตราความเร็วในการทำนุบำรุงเฉพาะคือ a อาจถูกถือได้อีกอย่างหนึ่งว่าเป็นอัตราความเร็วในการถ่ายเทโยกย้ายเปลี่ยนแปลง (turnover rate) ของชีวมวลและมีประโยชน์ในการเปรียบเทียบอัตราความเร็วในการถ่ายเทโยกย้ายเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของชีวมวลกับความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุง

8.3.3 ความสำคัญและการควบคุมพลังงานเพื่อการทำนุบำรุง

ตารางที่ 8.4 แสดงค่าสัมประสิทธิของพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงสำหรับโปรคิสท์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ซึ่งมีช่วงตั้งแต่ 0.5 (mmol ATP. g dry biomass^{-1}h^{-1}) สำหรับยีสท์โดยไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์จนถึง 220(mmol ATP g dry biomass^{-1}h^{-1}) สำหรับ Azotobacter ที่ตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะซึ่งมีออกซิเจนละลายอยู่ด้วยความเครียดสูง (high dissolved oxgen tension) เป็นที่แน่ชัดแล้วว่าพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงอาจเป็นพลังงานส่วนใหญ่ของพลังงานทั้งหมดที่ใช้ Stouthamer และ

Bettenhausen (1973) ได้ตรวจสอบว่าเมื่อ Klebsiella aerogenes เจริญเติบโตในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะเป็น $0.1\ h^{-1}$ พลังงานเพื่อการทำนุบำรุงจะสูงถึง 90% ของแหล่งพลังงานทั้งหมดที่ใช้ ค่าของ m สำหรับ K. aerogenes ที่พบโดย Stouthamer และ Bettonhausen จะเป็นประมาณ 3 หรือ 4 เท่าของที่ได้เคยถูกรายงานมาก่อนสำหรับจุลินทรีย์นี้ (Pirt, 1965) ความแตกต่างเช่นนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากมีแหล่งพลังงานซึ่งมากเกินพอในเชื้อจุลินทรีย์ที่ศึกษาโดย Stouthamer แต่ในเชื้อจุลินทรีย์ที่ศึกษามาก่อนมีแหล่งพลังงานเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต

ผลงานของ Watson (1970) และของ Stouthamer กับ Bettenhausen (1973) ได้ให้ไว้ในตารางที่ 8.4 แสดงว่าความแข็งไอออน (ionic strength) ของสื่อกลางอาหารมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการใช้พลังงานเพื่อการทำนุบำรุง

Watson พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ (1.0M) ลงในสื่อกลางอาหารทำให้ m_{ATP} เพิ่มขึ้นถึงสี่เท่าและยังมีผลต่อเส้นทางการเมตาโบลิซึมซึ่งลดปริมาณการผลิต ATP จากน้ำตาลกลูโคสลงด้วย Stouthamer และ Bettenhausen พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ NH_4Cl จาก 0.2% เป็น 0.4% ทำให้ m_{ATP} เพิ่มขึ้นอีก 11 (mmol ATP. g dry biomass$^{-1}h^{-1}$) จากการสังเกตุแสดงว่าส่วนใหญ่ของพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงถูกใช้ไปเกี่ยวกับงานการออสโมซิสเพื่อรักษาไว้ให้ความเข้มข้นแตกต่างกันระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์

ผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงยังไม่ได้ถูกตรวจสอบอย่างเป็นระบบ จากการศึกษาของ Harrison และ Loveless (1971 a) พบว่าพีชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากน้ำตาลกลูโคสสำหรับ Escherichia coli ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 15 ถึง 36 องศาเซลเซียสนั้นคงที่จึงแสดงว่า m อาจได้รับผลจากอุณหภูมิเพียงเล็กน้อย แต่พีเอชมีผลต่อพีชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากกลูโคสอย่างเห็นได้ชัด การลดลงของพีเอชจาก 6.6 ถึง 5.4 มีผลทำให้ q_{O_2} เพิ่มขึ้นซึ่งก็เกี่ยวเนื่องกับการเพิ่มขึ้นของ m_{ATP}

ตารางที่ 8.4 Some values of maintenance energy requirements of protists with glucose as the energy source

Organism	Special growth conditions	Maintenance energy	
		m (g energy source/ g dry biomass.h)	m_{ATP} (mmol ATP/ g dry biomass.h
Lactobacillus casei[1]		0·135†	1·5
Aerobacter cloacae[2]	aerobic, glucose-limited	0·094	14*
Klebsiella aerogenes[3]	anaerobic, tryptophan-limited NH_4Cl (2 g/l)	2·88	39
Klebsiella aerogenes[3]	anaerobic, tryptophan-limited NH_4Cl (4 g/l)	3·69	50
Saccharomyces cerevisiae[4]	anaerobic	0·036	0·52
Saccharomyces cerevisiae[4]	anaerobic NaCl (1·0 M)	0·360	2·2
Penicillium chrysogenum[5]	aerobic	0·022	3·2*
Azotobacter vinelandii[6]	Fixing nitrogen, dissolved oxygen tension (0·2 atm)	1·5*	220*
Azotobacter vinelandii[6]	Fixing nitrogen, dissolved oxygen tension (0·02 atm)	0·15*	22*

* Assuming 26 moles ATP produced/mole glucose, i.e. P/O = 2

† Assuming 1 mole glucose produces 2 moles ATP

[1]De Vries *et al.* (1970), [2]Pirt (1965), [3]Stouthamer & Bettenhausen (1973), [4]Watson (1970), [5]Righelato *et al.* (1968), [6]Nagai & Aiba (1972)

พลังงานที่ใช้เพื่อการโยกย้ายถ่ายเทเปลี่ยนแปลงสาร เซลล์อาจถูกตรวจสอบได้โดยเปรียบเทียบอัตราความเร็วในการถ่ายเทเปลี่ยนแปลงซึ่งหรามค่าแล้วกับอัตราความเร็วในการทำนุบำรุงเฉพาะ อัตราความเร็วในการโยกย้ายถ่ายเทเปลี่ยนแปลงโปรตีนสำหรับแบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโตถูกตรวจสอบได้เป็น 0.006 h^{-1}(0.6%/h) แต่จะเพิ่มสูงขึ้นเป็นสิบเท่าเมื่อการเจริญเติบโตหยุดลง (Mandelstam, 1960) เมื่อถือว่าชีวมวลมีโปรตีน 60% อัตราความเร็วในการถ่ายเทเปลี่ยนแปลงโปรตีนในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตจะสอดคล้องกันกับอัตราความเร็วในการถ่ายเทเปลี่ยนแปลงชีวมวล คือ 0.6 x 0.006 h^{-1} เท่ากับ 0.0036 h^{-1} ในแง่ที่ต่างออกไปเนื่องจากอัตราความเร็วในการทำนุบำรุงเฉพาะสำหรับ E.coli มีประมาณ 0.06 h^{-1} ดังนั้นการถ่ายเทเปลี่ยนแปลงโปรตีนจึงไม่อาจถือได้ว่าเป็นส่วนซึ่งมีความสำคัญสำหรับพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต อัตราความเร็วในการถ่ายเทเปลี่ยนแปลงโปรตีนของ E.coli ในสภาวะที่ไม่มีการเจริญเติบโต (6% h) ก็สอดคล้องกันกับอัตราความเร็วในการทำนุบำรุงเฉพาะคือ 0.036 h^{-1} Brooks และ Merrs (1973) ได้สังเกตุว่าเมื่อซับสเตรตพลังงานเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต ถ้าหยุดให้แหล่งพลังงานจะทำให้ ลดลง ปรากฏการณ์เช่นนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากโปรตีนมีการถ่ายเทเปลี่ยนแปลงมากขึ้นในขณะที่การเจริญเติบโตหยุดลง ส่วนประกอบส่วนใหญ่อีกอย่างหนึ่งของเซลล์ซึ่งมีการถ่ายเทเปลี่ยนแปลงมาก คือ RNA แต่ปริมาณในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต (<0·5%/h) ถูกถือว่าเป็นเพียงส่วนน้อยของพลังงานเพื่อการทำนุบำรุง (Mandelstam, 1960) ในแบคทีเรียบางชนิดการถ่ายเทเปลี่ยนแปลงสารที่เป็นองค์ประกอบของผนัง เซลล์อาจถูกถือว่าเป็นส่วนใหญ่ของพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงในระหว่างการเจริญเติบโต

สปีชี่ต่าง ๆ ของ Azotobacter มักถูกกล่าวถึงเป็นเชิงยกเว้นในแง่ซึ่งมีค่า q_{O_2} สูง จากงานทดลองต่าง ๆ ในปัจจุบันได้แสดงให้เห็นว่าค่ายกเว้นที่สูงนี้เกิดขึ้นเฉพาะเมื่อแบคทีเรียนี้กำลังตรึงไนโตรเจนในสภาพซึ่งมีออกซิเจนละลายอยู่ด้วยความเครียดสูง เนื่องจากพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเครียดออกซิเจนที่ละลายอยู่ (Nagai และ Aiba , 1972) จึงอาจหมายความว่าเซลล์มีการกำจัดออกซิเจนที่สามารถยับยั้งระบบเอนไซม์ไนโตรจีเนสซึ่งต้องการสภาพรีดิวซ์สูง

จากที่กล่าวมาข้างต้นดูเหมือนว่าพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงเป็นพลังงานส่วนใหญ่ที่ต้องการสำหรับพวกโปรตีสท์ อย่างไรก็ตามมีการเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมากสำหรับพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงและปัจจัยต่าง ๆ ที่ควบคุมเซลล์จึงต้องมีการศึกษาต่อไปให้มากขึ้น

8.4 ผลกระทบเนื่องจากพลังงานเพื่อการทำนุบำรุง

8.4.1 ผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตกับความเข้มข้นของซับสเตรตพลังงาน

ความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงของเซลล์จะมีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตกับความเข้มข้นของซับสเตรตพลังงานจากสมการที่ 8.11 และ 2.20 จะได้ว่า

$$q_E = \mu / Y_{EG} + m = q_m s/(s+K_s) \qquad 8.18$$

ดังนั้น

$$\mu = \mu_m s/(s+K_s) - m Y_{EG} \qquad 8.19$$

ซึ่ง $\mu_m = q_m Y_{EG}$ เมื่อ $s \gg K_s$

$$\mu = \mu_m - m Y_{EG} \qquad 8.20$$

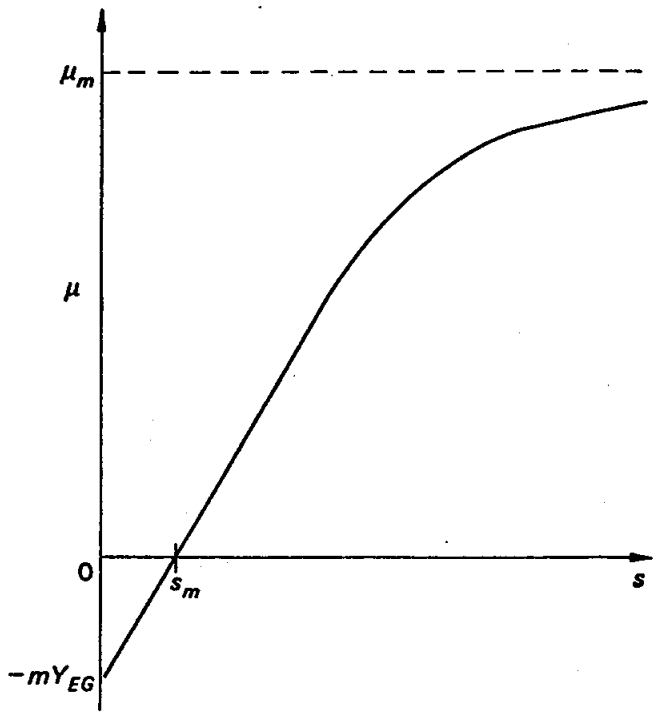
ให้ $s = s_m$ เมื่อ $\mu = 0$ ในสมการที่ 8.19 จะได้ว่า

$$s_m = m K_s Y_{EG}/(\mu_m - m Y_{EG}) \qquad 8.21$$

และเมื่อ $s = 0$

$$\mu = -m Y_{EG} \qquad 8.22$$

เส้นกราฟที่ใช้แทนสมการที่ 8.19 ได้แสดงไว้ในรูปที่ 8.2



รูปที่ 8.2 Relation (Eqn *8.19*) between specific growth rate (μ) and concentration of energy source (s) when there is a constant maintenance coefficient (m).

ตามแบบอย่างดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุดจะลดลงถ้ายังมีความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงอยู่ และอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตจะกลายเป็นศูนย์ที่ความเข้มข้นจำกัดอันหนึ่ง (s_m) ของซับสเตรตพลังงาน การเปลี่ยงเบนของสมการที่ 8.19 จากสมการที่ 2.21 จะสำคัญยิ่งถ้า m มีค่ามาก การตรึงไนโตรเจนของ Azotobactor ในสภาวะที่มีส่วนความดันออกซิเจนสูง (high oxygen partial-pressure) ก็อาจเป็นกรณีหนึ่งในที่นี้

8.4.2 ผลต่อการเจริญเติบโตในการหมักแบบคงที่ทางเคมี

ความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงมีความสำคัญต่อการปรับปรุงทฤษฎีเชิงปริมาณของการหมักแบบคงที่ทางเคมี สำหรับอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตก็ยังคงกำหนดได้ว่า

$$dx/dt = (\mu - D)x \qquad 8.23$$

แต่ถ้าแหล่งพลังงานเป็นซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตจะได้ว่า

$$ds/dt = D(s_r - s) - \mu x/Y_{EG} - mx \qquad 8.24$$

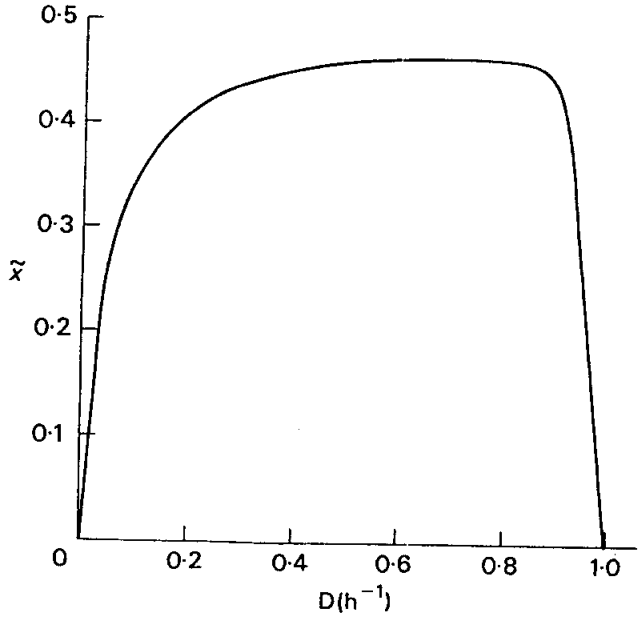
แทนค่าสำหรับ μ ในสมการที่ 8.19 เมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงคือเมื่อ $dx/dt = ds/dt = 0$ และ $\mu = D$ จะได้ว่า

$$\tilde{s} = (D + mY_{EG})K_s/(\mu_m - mY_{EG} - D) \qquad 8.25$$

และในสมการที่ 8.24 จะได้ว่า

$$\tilde{x} = DY_{EG}(s_r - \tilde{s})/(D + mY_{EG}) \qquad 8.26$$

ผลของความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงต่อสถานะมั่นคงของชีวมวลในการหมักแบบคงที่ทางเคมีได้แสดงไว้ในรูปที่ 8.3



รูปที่ 8.3 Steady-state biomass concentration ($\tilde{x}$) as a function of dilution rate (D) in a chemostat when there is a maintenance requirement for the growth-limiting substrate: $\mu_m = 1{\cdot}0\ h^{-1}$, $K_s = 0{\cdot}005\ g\ l^{-1}$, $s_r = 1{\cdot}0\ g\ l^{-1}$, $Y_{EG} = 0{\cdot}5$ g biomass (g substrate)$^{-1}$, $m = 0{\cdot}08$ g substrate (g.biomass.h)$^{-1}$.

8.4.3 ผลต่อการเจริญเติบโตในการหมักแบบเก็บกัก

ผลของความต้องการพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงสำหรับซับสเตรตที่กำหนดจำกัดการเจริญเติบโตในการหมักแบบเก็บกักจะลดค่า μ ลง (จากการทำนายโดยสมการที่ 8.19) และลดพืชผลการเจริญเติบโต ปริมาณของแหล่งพลังงานที่ใช้ในช่วงระหว่างเวลา t

จะถูกกำหนดได้เป็น

$$\Delta s_E = (x - x_0)/Y_{EG} + m\int_{x_0}^{x} x\,dt \qquad 8.27$$

x_0 และ x คือชีวมวลที่เวลา o และ t ตามลำดับ โดยการตรวจสอบค่า Δs_E ที่สองอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตแตกต่างกันแล้วประเมินค่าอินทีเกรตจากการวิเคราะห์ตัวนวนหรือจากกราฟก็จะทำให้สามารถตรวจสอบหาค่า m ได้ Monod (1942) ได้ใช้วิธีการนี้ตรวจสอบหาค่า m สำหรับ Escherichia coli ซึ่งเปลี่ยนแปลงค่า μ ได้โดยจำกัดการให้อากาศ พบว่าเมื่อใช้แลคเตทเป็นแหล่งพลังงาน m มีค่าเท่ากับศูนย์ ความล้มเหลวในการตรวจสอบพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงใด ๆ อาจเนื่องจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตแตกต่างกันน้อยมาก หรือเนื่องจากพืชผลพลังงานในรูปเอทีพีเพิ่มขึ้นเมื่อการให้อากาศถูกจำกัดจนกระทั่งปิดบังพลังงานเพื่อการทำนุบำรุง

8.5 พืชผลหรือประสิทธิภาพการผลิตพลังงานในรูปเอทีพี (ATP yield)

Bauchop และ Elsden (1960) ได้กำหนดพืชผลหรือประสิทธิภาพการผลิตพลังงานในรูปเอทีพี (Y_{ATP}) ของชีวมวลไว้ดังนี้

$$Y_{ATP} = MY_E/n \qquad 8.28$$

n = จำนวนโมล(mole) ของเอทีพีที่สิ่งมีชีวิตได้จากการเมตาโบลิซึมหนึ่งโมลของแหล่งพลังงาน M = น้ำหนักโมเลกุล(กรัม) ของแหล่งพลังงาน และ MY_E คือพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตเป็นโมลาร์(molar growth yield) เมื่อ Y_E ถูกแสดงออกเป็นกรัมของชีวมวลแห้ง/กรัมของแหล่งพลังงาน Bauchop และ Elsden พบว่า Y_{ATP} มีค่าประมาณ 10.5 และขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ลักษณะเช่นนี้ก็เป็นไปตามสมการที่ 8.28 ซึ่งปริมาณของแหล่งพลังงานที่ต้องการเพื่อสังเคราะห์ชีวมวลจำนวนหนึ่งควรเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อจำนวน (n) โมลของเอทีพีที่เกิดขึ้นต่อโมลของแหล่งพลังงาน ปัจจัยซึ่งมีอิทธิพลต่อการเกิดเอทีพี เช่น ปฏิกริยาออกซิเดทีฟฟอสฟอรีเลชั่นที่ไม่ถูกควบ หรือการเปลี่ยนแปลงเส้นทางการเมตาโบลิซึมจะมีอิทธิพลต่อ Y_E อีกทั้งพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงจะมีผลต่อ Y_{ATP} โดยมีผลต่อ Y_E ดังแสดงในสมการที่ 8.19 ดังนั้นค่าสูงสุดของ Y_{ATP} คือ Y_{ATP}^{max} ถูกกำหนดได้โดยความสัมพันธ์ต่อไปนี้ซึ่งดัดแปลงมาจากสมการที่ 8.11 คือ

$$q_{ATP} = \frac{\mu}{Y_{ATP}^{max}} + m_{ATP} = \frac{\mu}{Y_{ATP}} \qquad 8.29$$

ซึ่งหน่วยของแหล่งพลังงานในที่นี้คือหนึ่งกรัมโมเลกุลของ เอทีพี Stouthamerและ Bettenhausen (1973) ได้ชี้ให้เห็นว่าผลของพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงต่อ Y_{ATP} ถูกทำให้ต่ำกว่าที่ประมาณการไว้เป็นอย่างมากและเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้พบว่าค่าของ Y_{ATP} มีช่วงกว้างขวางมาก

การคำนวนหาค่าของ Y_{ATP} ทางทฤษฎีขึ้นอยู่กับพื้นฐานซึ่งทราบว่าพลังงานที่ต้องการเพื่อการสังเคราะห์เซลล์แบคทีเรียจากน้ำตาลกลูโคส แอมโมเนีย และเกลือแร่ต่าง ๆ ให้ค่าของ Y_{ATP} สูงถึง 28.8 (Stouthamer, 1973) ค่าทางทฤษฎีนี้ได้รับอิทธิพลเพียงเล็กน้อยจากการทดแทนแอมโมเนียด้วยกรดอะมิโนแต่การเติมเบสของกรดนิวคลีอิกจะทำให้ค่าสูงสุดทางทฤษฎีของ Y_{ATP} สูงขึ้นถึง 32.1 (Stouthamer, 1973) จากการทดลองโดย Hernandez และ Johnson (1967) เสนอว่าในทางปฏิบัติค่าของ Y_E ได้รับผลเพียงเล็กน้อยจากการเติมกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิกเบสและวิตามินต่าง ๆ ลงในสื่อกลางสารอาหารขั้นต่ำ (minimal medium) สำหรับแบคทีเรีย ค่าสูงสุดทางทฤษฎีของ Y_{ATP} เพื่อการสังเคราะห์ชีวมวลจากคาร์บอนไดออกไซด์ (autotrophic metabolism) นั้นต่ำมากคือ 4.85 และถ้าใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งพลังงานจะได้ค่าสูงสุดทางทฤษฎีเป็น 10.0 (stouthamer, 1973) จากการประเมินค่าอีกครั้งหนึ่งของตัวเลข Y_{ATP} สำหรับการสังเคราะห์เซลล์จากคาร์โบไฮเดรต Stouthamer และ Bettenhausen (1973) ได้สรุปว่าค่า Y_{ATP}^{max} เท่ากับ 25 สามารถถูกทำให้เกิดขึ้นได้ด้วยเชื้อแบคทีเรีย อีกทั้งยังได้ตรวจสอบด้วยว่าจำนวนโมลของ เอทีพีที่เกิดขึ้นต่อหนึ่งอะตอมของออกซิเจนที่ถูกนำเอาเข้าไป (P/O ratio) สำหรับบางสปีชีของแอโรบิคแบคทีเรียคือ 1.9

จึงสรุปได้ว่าโมเลกุลของ เอทีพีที่เป็นผลผลิตพลังงานทั้งหมด (n) ที่ได้ต่อหนึ่งโมลของแหล่งพลังงานทั้งอยู่บนพื้นฐานของพืชผลหรือประสิทธิภาพในการผลิตชีวมวลจากแหล่งพลังงานซึ่งอาจทำนายได้ และค่าของ Y_{ATP} อาจเปลี่ยนแปลงได้จากประมาณ 5 ถึง 32 กรัมชีวมวลแห้งต่อหนึ่งโมลของ เอทีพี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของแหล่งคาร์บอน อีกทั้งค่าที่พบยังอาจถูกทำให้ลดลงต่ำลงกว่าค่าสูงสุดทางทฤษฎีได้เป็นอย่างมากเนื่องจากเอทีพีถูกใช้ไปเป็นพลังงานเพื่อการทำนุบำรุงและโดยการไม่คู่ควบกับการผลิตเอทีพีจากแหล่งพลังงานที่ถูกใช้ไป

8.6 สภาวะที่มีผลต่อการเมตาโบลิซึมของซับสเตรทคาร์บอนและพลังงาน

เส้นทางการเมตาโบลิซึม ผลผลิตสุดท้าย และพืชผลหรือประสิทธิภาพในการผลิตเอทีพีจากการเมตาโบลิซึมของแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนอาจได้รับอิทธิพลจากความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย ค่าพีเอช อุณหภูมิ ความแข็งไอออน (ionic strength) และการขาดแคลนธาตุรองต่าง ๆ (trace element deficiency) การเมตาโบลิซึมของแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนยังได้รับผลจากอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะและขึ้นอยู่กับว่าแหล่งธาตุคาร์บอนนั้นเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตหรือมีมากเกินพอ

อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะมีผลต่อการหมักน้ำตาลกลูโคสโดย Lactobacillus casei (De Vries et al., 1970) คือที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตต่ำจะได้อะซีเตท ฟอร์เมตและอีทานอลเป็นผลผลิตสุดท้าย ส่วนที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงน้ำตาลกลูโคสจะถูกหมักให้เป็นกรดแลคติคไดทั้งหมด การใช้น้ำตาลกลูโคสภายใต้สภาพที่มีแก๊สออกซิเจนโดย Klebsiella aerogenes และมีไนโตรเจนจำกัด Tempestและคณะ (1967) พบว่ามี α-ketoglutarate เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตซึ่งต่ำมากแต่จะไม่เกิดขึ้นที่อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูง

เมื่อ K. aerogenes ถูกจัดเตรียมให้มีน้ำตาลกลูโคสและออกซิเจนมากเกินพอจะมีการสะสมโพรูเวทเป็นจำนวนมาก แต่เมื่อมีน้ำตาลกลูโคสจำกัดจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงแหล่งธาตุคาร์บอนทั้งหมดอย่างเหมาะสมไปเป็นชีวมวลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Harrison & Pirt, 1967) Aerobacter cloacae เมื่อถูกจัดเตรียมให้มีน้ำตาลกลูโคสและออกซิเจนมากเกินพอจะมีการสะสมอะซีเตท (Pirt, 1957) ดังนั้นจึงปรากฏว่าเมื่อแบคทีเรียถูกจัดเตรียมให้มีแหล่งพลังงานและคาร์บอนมากเกินพอและมีออกซิเจนมากเกินพอจะมีการออกซิเดชั่นที่ไม่สมบูรณ์เกิดขึ้นได้ เช่นเดียวกันกับเมื่อแหล่งพลังงานถูกจัดเตรียมให้มีมากเกินพอก็อาจถูกเก็บสะสมไว้เป็นแหล่งพลังงานสำรองประกอบเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งจำนวนค่อนข้างมากในน้ำหนักชีวมวลแห้ง (Wilkinson & Munro, 1967)

8.7 การใช้แหล่งธาตุคาร์บอนหลายแหล่งปะปนกัน

มีบ่อยครั้งที่เดียวที่การหมักแบบเก็บกักมีแหล่งธาตุคาร์บอนหลายแหล่งปะปนกัน แต่ถูกใช้ต่างกันเป็นลำดับ ตัวอย่าง เช่นใช้น้ำตาลกลูโคสก่อนน้ำตาลแลคโตสโดย Escherichia เป็นต้น (Monod, 1942) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ซับสเตรตอย่างหนึ่งอาจถูกยับยั้งได้โดยซับสเตรตอีกอย่างหนึ่งอันเป็นผลเนื่องมาจากการสกดยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์และการยับยั้งเอนไซม์ permease (Miles & Pirt, 1973)

ในการหมักแบบคงที่ทางเคมีเมื่อใช้แหล่งธาตุคาร์บอนสองแหล่งผสมกันและการเจริญเติบโตถูกกำหนดจำกัดด้วยธาตุคาร์บอน ซับสเตรตทั้งสองอาจถูกใช้ได้พร้อมกันตลอดช่วงของอัตราความเร็วในการเจือจางซึ่งกว้างมาก ตัวอย่าง เช่น กลูโคสกับแลคโตสโดย Klebsiella aerogenes (Baidya et al., 1967) กลูโคสกับมอลโตสโดย K. aerogenes (Harte & Webb, 1972)และกลูโคสกับไซโลสโดยEscherichia coli (Standing et al., 1972) เมื่อแหล่งธาตุคาร์บอนไม่ได้เป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโต ตัวอย่าง เช่น เมื่อธาตุไนโตรเจนเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตพบว่าจุลินทรีย์ชอบที่จะใช้แหล่งธาตุคาร์บอนแหล่งเดียวมากกว่า กรณีเช่นนี้ได้แก่อะซีเตตมักถูกใช้ก่อนน้ำตาลกลูโคสโดย Pseudomonas สปีชี่ต่าง ๆ (Ng & Dawes, 1973)ทั้ง ๆ ที่แหล่งธาตุคาร์บอนทั้งสองนี้อาจถูกใช้พร้อมกันได้เมื่อเชื้อจุลินทรีย์ถูกจำกัดการเจริญเติบโตด้วยธาตุคาร์บอน

8.8 การจัดเตรียมคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อการหมัก

ความต้องการคาร์บอนไดออกไซด์มีจุดประสงค์สองประการ คือ (1) เป็นแหล่งธาตุคาร์บอนสำหรับออโตโทรฟิกแบคทีเรียและสาหร่าย (2) เป็นสารระหว่างกลางที่จำเป็นสำหรับขบวนการเมตาโบลิซึ่มของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ดังนั้นคาร์บอนไดออกไซด์จึงต้องปรากฏอยู่ในสื่อกลางการหมักทุกอย่าง

ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นและที่ถูกกำจัดออกโดยการถ่ายเทจากวัฏภาค (phase) ของเหลวไปยังวัฏภาคแกส ดังนั้นสำหรับการหมักแบบเก็บกักจะได้ว่า

accumulation rate (R) = production rate − rate of transfer from liquid to gas

นั่นก็คือ

$$R = q_{CO_2}x - K_L a(c - c_s) \qquad 8.30$$

ซึ่ง K_L คือค่าคงที่, a = พื้นผิวประชิดระหว่างแกสกับของเหลวต่อหน่วยปริมาตร , c = ความเข้มข้นที่แท้จริงของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลาย , c_s = ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในภาวะสมดุลย์กับวัฏภาคแกส (ให้เปรียบเทียบกับการถ่ายเทออกซิเจนในตอนที่ 9.6.1) ใส่ค่า H สำหรับ Henry's constant และ p_l กับ p_g สำหรับส่วนความดัน (partial pressure) ของแกสคาร์บอนไดออกไซด์ในวัฏภาคของเหลวและวัฏภาคแกสตามลำดับ สมการที่ 8.30 จะกลายเป็น

$$R = q_{CO_2}x - K_L aH(p_l - p_g) \qquad 8.31$$

ถ้าไม่มีการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งก็คือ $q_{CO_2}=0$ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปในวัฏภาคแกสจึงได้ว่า $p_g > p_l$ สำหรับการหมักแบบคงที่หางเคมีจำเป็นต้องเติมทางขวามือของสมการที่ 8.30 ด้วยค่า $-Dc$ หมายถึงการล้างออกไปของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอย่างไรก็ตามค่านี้อาจถูกละทิ้งได้ ดังนั้นเมื่ออยู่ในสถานะมั่นคงคือเมื่อ $R=0$ จากสมการที่ 8.31 จะได้ว่า

$$\tilde{p}_l = \tilde{p}_g + q_{CO_2}\tilde{x}/K_L aH \qquad 8.32$$

การควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายแบบอัตโนมัติโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์อีเล็คโตรดได้รับความสำเร็จโดย Ishizaki และคณะ (1973)

8.9 ความสมดุลย์ระหว่างคาร์บอเนตกับคาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์ในสารละลายมีการรวมตัวกับน้ำได้เป็นกรดคาร์บอนิกซึ่งอาจ

แตกตัวเป็นไบคาร์บอเนตและคาร์บอเนตไอออนได้ดังนี้

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$
$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$
$$HCO_3^- \rightleftharpoons H^+ + CO_3^{2-}$$

ความเข้มข้นทั้งหมดของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลาย S คือผลรวมความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์และกรดคาร์บอนิค จะได้ว่า

$$S = [CO_2] + [H_2CO_3] = HPCO_2 \qquad 8.33$$

ในวงเล็บเหลี่ยมหมายถึงความเข้มข้น และ PCO_2 คือส่วนความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลาย ค่า H สำหรับคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งละลายน้ำที่ 30° ซ คือ 0.030 mol/atm จะเห็นได้ว่าค่านี้สูงเป็นสามสิบเท่าของออกซิเจน สำหรับค่าคงที่ในการแตกตัวเป็นไอออน (ionization constant) ของ H_2CO_3 จะได้ว่า

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{S} = 10^{-6.3} \quad \text{at } 30°C \qquad 8.34$$

ดังนั้น

$$\log [HCO_3] = \log S + pH - pK_1 \qquad 8.35$$

ซึ่ง $pK_1 = -\log K_1$ สำหรับการแตกตัวเป็นไอออน(ionization) ของ HCO_3^- จะได้ว่า

$$K_2 = \frac{[H^+][CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-]} = 10^{-10.3} \quad \text{at } 30°C \qquad 8.36$$

ดังนั้น

$$\log [CO_3^{2-}] = \log [HCO]_3^- + pH - pK_2 \qquad 8.37$$

สำหรับความเข้มข้นซึ่งแน่นอนควรแทนค่าด้วยค่าความไว (activity) อย่างไรก็ตาม เพื่อจุดประสงค์ในที่นี้ถือว่าสัมประสิทธิความไว(activity coefficient) ต่าง ๆ เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน การคำนวนหาความเข้มข้นของไบคาร์บอเนตและคาร์บอเนตไอออนที่ค่าพีเอชต่าง ๆ โดยมี PCO_2 ที่ 10^{-2} บรรยากาศได้ให้ไว้ในตารางที่ 8.5 ที่ค่าพีเอช 10 ดูเหมือนว่า PCO_2 ในเชื้อจุลินทรีย์สามารถถูกรักษาไว้ได้ที่ 10^{-2} บรรยากาศเนื่องจากมีไบคาร์บอเนตเข้มข้นสูงมาก

ตารางที่ 8.5 The concentrations of bicarbonate and carbonate ions at various pH values with carbon dioxide partial pressure at 10^{-2} atm

pH Value	$[HCO_3^-]$ (M)	$[CO_3^{2-}]$ (M)
4	$1{\cdot}50\times10^{-6}$	$7{\cdot}5\times10^{-10}$
7	$1{\cdot}50\times10^{-3}$	$7{\cdot}5\times10^{-7}$
10	1·50	$7{\cdot}5\times10^{-4}$

Temperature, 30°C; the concentrations were calculated from Eqn *8.35* and *8.37* with $S=0{\cdot}03\times10^{-2}$ M

8.10 อิทธิพลของส่วนความดันแกสคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตและเมตาโบลิซึม

การศึกษาถึงผลของส่วนความดันแกสคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตยังอยู่ในวงจำกัดเมื่อเทียบกับการศึกษาถึงผลของการมีหรือไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ผลจากการทดลองของ Dagley และ Hinshelwood (1938) แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของ Klebsiella aerogenes และ P_{CO_2} เป็นไปแบบขยาย (hyperbolic form) โดยที่ครึ่งหนึ่งของอัตราความเร็วสูงสุดในการเจริญเติบโตเกิดขึ้นที่ P_{CO_2} เท่ากับ 3×10^{-4} บรรยากาศ ซึ่งก็เท่ากับส่วนความดันของแกสคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศที่ 1 บรรยากาศ เนื่องจากการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์ถูกกำหนดโดย S ในสมการที่ 8.33 จะได้ว่า $K_s=0{\cdot}9\times10^{-5}$ M ซึ่งก็ใกล้เคียงกันกับค่าของคาร์บอนซับสเตรตโดยทั่วไป อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงสุดของ K. aerogenes ต้องการ P_{CO_2} ประมาณ 10^{-3} บรรยากาศ จากผลการทดลองของ Lowff และ Monod (1947) แสดงให้เห็นว่าอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตของ Escherichia coli ในสื่อกลางสารอาหารขั้นต่ำของน้ำตาลกลูโคสถูกทำให้ลดต่ำลงเป็นอย่างมากเมื่อ $P_{CO_2}=3\times10^{-5}$ atm อย่างไรก็ตามผลเช่นนี้อาจถูกยับยั้งได้โดยการเติม 10^{-4} M ของกลูตาเรต ซักซิเนต แอสปาราจีน หรือกลูตาเมต ซึ่งสารอย่างหลังนี้ให้ผลดีที่สุดแต่การเจริญเติบโตก็ดูเหมือนว่าจะหยุดลงเมื่อ $P_{CO_2}=6\times10^{-6}$ atm และไม่

สามารถทำให้กลับคืนมาได้โดยการเติมสารต่าง ๆ ลงไปจึงคล้ายกับว่าสารที่ใช้เพิ่มเติมลงไปนั้นไม่สามารถใช้ทดแทนคาร์บอนไดออกไซด์ได้ทั้งหมดเพียงแต่ทำหน้าที่เป็นสารสำรองของคาร์บอนไดออกไซด์เท่านั้น

PCO_2 ยังได้เคยถูกเสนอด้วยว่าสามารถเป็นสิ่งวิกฤตสำหรับการทำงานของจุลินทรีย์นอกเหนือไปจากการเจริญเติบโตได้ด้วย(Wimpenny, 1969) แต่จากหลักฐานโดยทั่วไปสำหรับผลเช่นนี้ยังไม่ได้ถูกทำให้แน่ใจมากนัก ในแง่ซึ่งแตกต่างออกไป Ishizaki และคณะ (1973) ได้ใช้เครื่องมือออโตมิติควบคุมความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายพบว่าการผลิตอินโดลที่สูงเกินกว่าปกติของ<u>Bacillus subtilis</u> ถูกยับยั้งได้อย่างรุนแรงโดย $PCO_2 > 0.03$ atm นอกจากนี้ผลจากการทดลองต่าง ๆ ยังชี้ด้วยว่าคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสิ่งที่ยับยั้งได้ดีกว่าไบคาร์บอเนตไอออน

8.11 <u>การใช้ไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอน</u>

เนื่องจากไฮโดรคาร์บอนเป็นสารประกอบซึ่งมีจำนวนมากและราคาถูกจึงกลายเป็นซับสเตรตที่สำคัญในการหมักเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและเพื่อเปลี่ยนแปลงให้เป็นผลผลิตซึ่งมีค่ามากขึ้นอย่างอื่น ๆ ลักษณะเด่นของไฮโดรคาร์บอนในแง่ที่เป็นซับสเตรตคือการไม่ละลายน้ำ การละลายของ n-alkane จะสูงขึ้นถึงประมาณ 60 มก./ลิตร เมื่อความยาวของเส้นโมเลกุลเริ่มตั้งแต่ C_2 ถึง C_4 แล้วจะลดลงตามลำดับเมื่อความยาวของเส้นโมเลกุลมีมากขึ้นดังสมการที่ 8.38

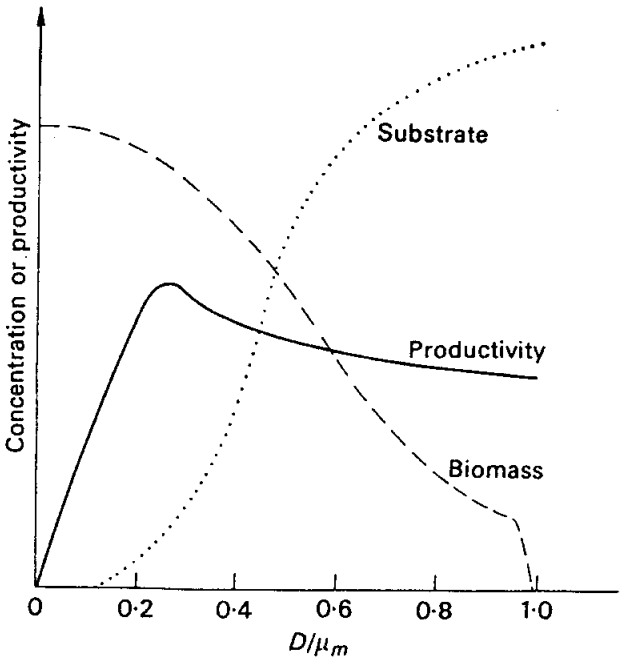
$$\log H = 4.526 - 0.588n \qquad 8.38$$

H คือความสามารถในการละลายเป็น มก./ลิตร และ n คือจำนวนอะตอมของธาตุคาร์บอนในเส้นโมเลกุล(Johnson, 1964) ตารางที่ 8.6 แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการละลายของ n-alkane ตกต่ำลงกว่า 10^{-5}M ที่ออกเทน

ตารางที่ 8.6 Solubility of *n*-alkanes in water at 25°C (Data from Johnson, 1964)

n-Alkane	Concentration of saturated solution (M)
Hexane	$1{\cdot}1 \times 10^{-4}$
Heptane	$2{\cdot}6 \times 10^{-5}$
Octane	$5{\cdot}8 \times 10^{-6}$
Decane	$3{\cdot}1 \times 10^{-7}$
Dodecane	$1{\cdot}7 \times 10^{-8}$
Tetradecane	$9{\cdot}8 \times 10^{-10}$

เนื่องจากโดยทั่วไปค่า K_s สำหรับแหล่งพลังงานและธาตุคาร์บอนคือ $> 10^{-5}$ M (ตารางที่ 2.1) แต่ดูเหมือนว่าไม่น่าจะเป็นไปได้สำหรับไฮโดรคาร์บอนชั้นสูง (โมเลกุลใหญ่) ซึ่งไฮโดรคาร์บอนที่ละลายไม่อาจถูกใช้ได้อย่างรวดเร็วเพียงพอเพื่อให้ได้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตเฉพาะที่มากกว่า 0.2 h^{-1} Johnson(1964) ได้คำนวนจากการแพร่กระจาย พิจารณาว่าแม้แต่เพียงที่ค่า Michaelis constant เท่ากับศูนย์ก็ยังไม่อาจทำให้ได้อัตราความเร็วในการเจริญเติบโตสูงขึ้นจนเป็นที่น่าพอใจได้ด้วย dodecane และไฮโดรคาร์บอนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่านี้จนกว่าจะมีกลวิธีการพิเศษเพื่อดึงเอาซับสเตรตเข้าไปใช้ กลวิธีการพิเศษปรากฏว่ามีการใช้ไฮโดรคาร์บอนโดยตรงจากวัฏภาคน้ำมัน(oil phase) ดังนั้นขนาดของหยดน้ำมันและพื้นผิวระหว่างน้ำกับน้ำมันจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่ออัตราความเร็วในการเจริญเติบโต(Humphrey & Erichson, 1972) ที่สำคัญก็คือด้วยสารประกอบ alkane ชั้นสูงอัตราความเร็วในการเจริญเติบโตในท้ายที่สุดจะถูกกำหนดจำกัดโดยพื้นผิวระหว่างน้ำกับน้ำมันและถูกสะท้อนให้เห็นได้โดยการเจริญเติบโตเป็นเส้นตรงที่เริ่มขึ้นในการหมักแบบเก็บกัก แบบจำลองต่าง ๆ สำหรับหมักแบบคงที่ทางเคมีของจุลินทรีย์ต่อการใช้น้ำมันซึ่งไม่ละลายน้ำโดยการนำเอาไฮโดรคาร์บอนจากน้ำมันโดยตรงเข้าไปในเซลล์ได้ถูกรวบรวมโดย Humphrey และ Erickson (1972) รูปที่ 8.4 แสดงถึงผลที่คาดหวังไว้จากการหมักในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยอัตราความเร็วในการเจือจางต่าง ๆ กันเมื่ออยู่ในสภาวะคงที่ทางเคมี Hemphrey และ Erickson ได้สรุปผลไว้ดังต่อไปนี้



รูปที่ 8.4 Generalized representation of effects of dilution rate on biomass concentration, substrate (hydrocarbon) concentration and productivity, that is biomass output rate: D=dilution rate, μ_m=maximum specific growth rate (redrawn from Humphrey & Erickson, 1972) for growth on hydrocarbons.

(1) ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องซึ่งมีวัตภาคที่ต้องถูกทำให้กระจายตัวอยู่ตลอดเวลาโดยทั่วไปจะทำให้ได้อัตราการใช้ประโยชน์จากซับสเตรตต่ำมากเว้นแต่ที่อัตราความเร็วในการเจือจางต่ำเท่านั้น (2) ความเข้มข้นของเซลล์ถูกทำให้ลดลงได้อย่างรวดเร็วด้วยอัตราความเร็วในการเจือจางต่าง ๆ ที่สูงขึ้น ปรากฏการณ์นี้ได้รับการยืนยันโดยผลการทดลองของ Munk และคณะ (1973) (3) ความสามารถในการผลิตที่เหมาะสม ($D\bar{x}$) จะไม่อาจเกิดขึ้นได้ที่ใกล้กับสภาวะการล้างออกแต่จะเกิดขึ้นได้ที่สภาวะค่อนข้างใกล้กับค่าต่ำสุดของ D/μ_{max} โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.4

จากการเปรียบเทียบพืชผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากไฮโดรคาร์บอนที่ใช้เป็นซับสเตรต (ตารางที่ 8.2) แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงธาตุคาร์บอนไปเป็นชีวมวลได้พืชผลประมาณใกล้เคียงกันกับการใช้ซับสเตรตอย่างอื่นแต่อย่างไรก็ตามข้อ

แตกต่างที่สำคัญระหว่างการเจริญเติบโตในไฮโดรคาร์บอนและการเจริญเติบโตในคาร์โบไฮเดรตคือการเจริญเติบโตในไฮโดคาร์บอนต้องการออกซิเจนมากกว่า (ตอนที่ 9.2) ผลผลหรือประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตจากไฮโดรคาร์บอนอาจถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้เป็นอย่างมากโดยการหมักแบบเก็บกักที่มีการเติมซับสเตรต (fed batch culture)ดังในตอนที่ 21.1 ด้วยซาตุคาร์บอนเป็นสิ่งกำหนดจำกัดการเจริญเติบโตแทนการหมักแบบเก็บกักอย่างง่ายด้วยไฮโดยคาร์บอนที่มีปริมาณมากเกินพอ (Yoshida et al., 1973)

8.12 การกระจายตัวของไฮโดรคาร์บอนในสื่อกลางอาหารเหลว

วิถีทางซึ่งสดวกต่อการเติมไฮโดรคาร์บอนแข็งลงไปในสื่อกลางการหมักคือการใช้ไฮโดรคาร์บอนอื่นที่เฉื่อยชาเป็นตัวทำละลาย เช่นใช้ 2, 6, 10, 14 -tetramethylpentadecane เพื่อละลาย C_{20} n-alkanes (Johnson, 1964)

สารที่กระทำต่อแรงดึงผิวของของเหลวจะช่วยทำหน้าที่เป็นสิ่งซึ่งทำให้เกิดอีมัลชั่น(emulsion)ถูกใช้เพื่อเพิ่มพื้นผิวระหว่างน้ำกับน้ำมันในเชื้อจุลินทรีย์ สารที่แนะนำเพื่อจุดประสงค์นี้คือ polyoxyethylene (20) oleyl ether (Kobayashi, et al., 1967) และ polyoxyethylene-polypropylene monostearate(Someya et al., 1970) มีหลักฐานแสดงด้วยว่ายีสต์และแบคทีเรียซึ่งใช้ไฮโดรคาร์บอนเป็นอาหารยังสามารถสังเคราะห์สิ่งที่ทำให้เกิดอีมัลชั่นได้เองอีกด้วย สารเมือกเหนียวที่มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดอีมัลชั่นถูกคัดแยกได้จากเชื้อ Pseudomonas สปีชี่ต่าง ๆ ที่เจริญเติบโตใน decane (Maclennan & Pirt, 1970) Suzukiและคณะ (1969) ได้คัดแยกtrehalose lipid ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำให้เกิดอีมัลชั่นจากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตอยู่ในไฮโดรคาร์บอน Goma และคณะ (1973) พบว่าเชื้อยีสต์ที่เจริญเติบโตอยู่ใน hexadecane ผลิตสารซึ่งชอบทำให้เกิดอีมัลชั่นกับ C_{16} มากกว่า alkane อื่น ๆ คุณสมบัติทางเคมีของสารที่ทำให้เกิดอีมัลชั่นโดยธรรมชาตินั้นยังคงมืดมนอยู่แต่อาจมีความสำคัญมากต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในไฮโดรคาร์บอน.