บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มที่ผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุดภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง

จากการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ SS3, SS4, FS3, SH5 และ ES16 ในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีการเติมเกลือ 3% ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทางทะเล (marine photosynthetic bacteria) (Watanabe *et al*., 1998) เนื่องจากเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเชื้อที่แยกได้จากแหล่งน้ำเค็ม เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 พบว่า ทุกสายพันธุ์มีการเจริญใกล้เคียงกัน โดยสายพันธุ์ SS3 เจริญได้ดีกว่าอีก 4 สายพันธุ์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยมีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร ส่วน 4 สายพันธุ์ที่เหลือให้ปริมาณมวลชีวภาพในช่วง 1.98-2.05 กรัมต่อลิตร สำหรับการเจริญของเชื้ออาจสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของสีโดยพบว่าในระยะแรกของการเจริญ สายพันธุ์ SS3, SS4, SH5, FS3 มีสีน้ำตาล แต่สายพันธุ์ ES16 มีสีน้ำตาลอมส้ม หลังจากเลี้ยงประมาณ 60 ชั่วโมง สีของเชื้อทุกสายพันธุ์เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม ทั้งนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสีของเชื้อคือ อากาศ ซึ่งในการเลี้ยงมีการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง ทำให้ในช่วงหลังมีอากาศเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากปริมาณน้ำหมักลดลง จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของเชื้อ เช่นเดียวกับกรณีของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter capsulatus* ซึ่งมีสีน้ำตาลอมส้มจนถึงสีน้ำตาลเข้ม เมื่อเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง แต่เมื่อเลี้ยงในสภาวะมีอากาศเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง เนื่องจากมีรงควัตถุคาโรทีนอยด์ชนิด spheroidene หรือทั้งชนิด spheroidene และ hydroxyspheroidene ที่สามารถเปลี่ยนเป็นชนิด ketocarotenoids ภายใต้สภาวะมีอากาศ เป็นผลให้เชื้อมีสีแดง (Imhoff *et al*., 1984) ในระหว่างการเจริญ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้ง 5 สายพันธุ์มีการย่อยสลายกลูตาเมต

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญ ค่าพีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม 5 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) ที่ 37 องศาเซลเซียส

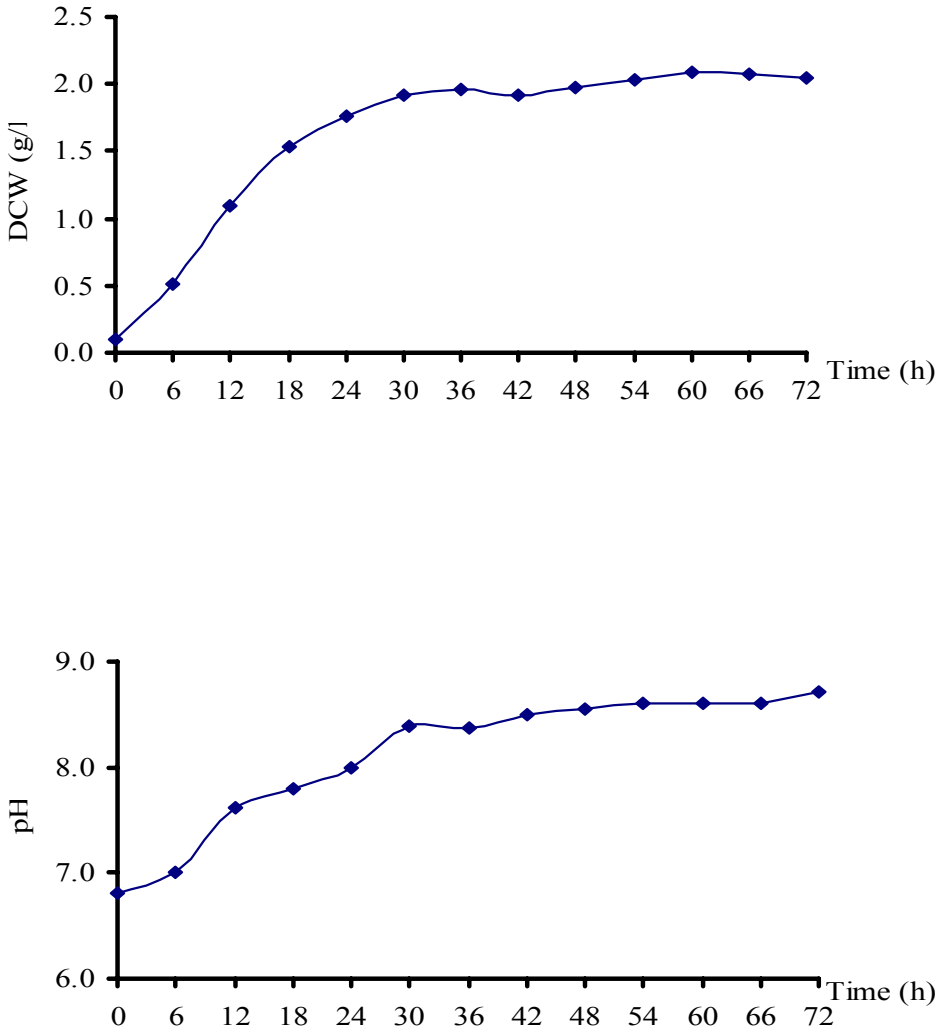
Table 2 Comparison on growth, pH and ALA production from five isolates of halotolerant photosynthetic bacteria cultivated in GM medium containing 3% NaCl at 24 h under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

Isolate no.	Initial pH	Final pH	Highest DCW (g/l)	Highest ALA (μM)
SS3	7.0	8.71	2.08	26
SS4	7.0	8.75	2.05	22
FS3	7.0	8.72	2.02	20
SH5	7.0	8.78	2.00	21
ES16	7.0	8.85	1.98	19

ยีสต์สกัด ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนีย (Pfenning, 1967) ส่งผลให้ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากพีเอชเริ่มต้นประมาณ 7.0 เป็น 8.71-8.75 หลังจากการเลี้ยง 72 ชั่วโมง และเมื่อพีเอชของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงมากเกินกว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ มีผลให้เชื้อเจริญลดลง (Sasaki and Nagai, 1979)

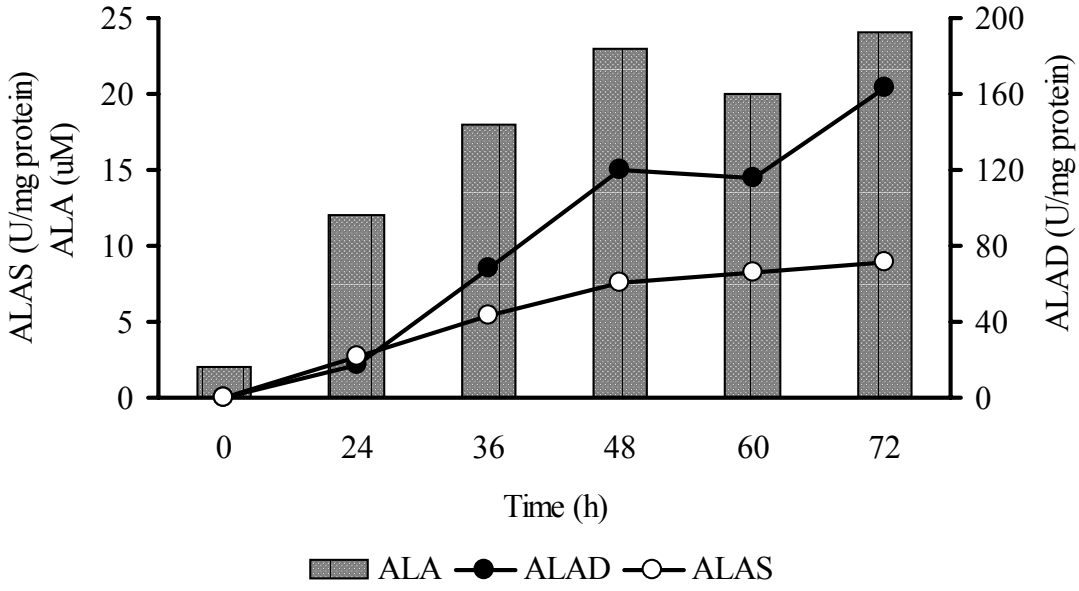
สำหรับการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ SS3 มีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุดเท่ากับ 26 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมากกว่าเชื้ออีก 4 สายพันธุ์ที่ผลิตได้ในช่วง 19-25 ไมโครโมลาร์ ผลที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ SS3 มีการเจริญและผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เมื่อทำ time course ของเชื้อที่คัดเลือก (รูปที่ 4) พบว่าจากพีเอช 7.0 เป็น 8.4 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง เชื้อเจริญอย่างรวดเร็วมีระยะ log phase 18 ชั่วโมง และเข้าสู่ stationary phase ที่เวลา 30 ชั่วโมง โดยมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและมีค่าสูงสุดที่ 60 ชั่วโมง แล้วเริ่มลดลง เนื่องจากปริมาณสารอาหารต่างๆ ถูกใช้ไปเกือบหมด พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อโดยมีค่าเริ่มต้นที่พีเอช 7.0 และเพิ่มเป็น 8.71 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (รูปที่ 5) พบว่าปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้นตามการเจริญที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าสูงสุด 23 ไมโครโมลาร์ที่เวลา 48 ชั่วโมงและลดลงเล็กน้อย (20 ไมโครโมลาร์) ที่เวลา 60 ชั่วโมง ก่อนจะเพิ่มขึ้นที่เวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายนอกเซลล์มีค่าเท่ากับ 25 ไมโครโมลาร์ และกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์เท่ากับ 3.05 ไมโครโมลาร์ จะเห็นว่าปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายนอกเซลล์มีค่าสูงกว่าปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์ถึง 8.2 เท่า แสดงว่าเชื้อมีการหลั่งกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายนอกเซลล์มากกว่า หรือกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์อาจเปลี่ยนไปเป็นสารเตตราไพโรล ทำให้มีปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์ต่ำกว่า ทั้งนี้เป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthetase และเอนไซม์ ALA dehydratase ที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาที่เชื้อมีการเจริญ โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงเอนไซม์ ALA synthetase และเอนไซม์ ALA dehydratase มีค่าเท่ากับ 2.7 และ 20 U/mg protein และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ ALA synthetaseและเอนไซม์



รูปที่ 5 การเจริญ และ พีเอช ระหว่างการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ SS3 ในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37°ซ

Fig. 5 Growth and pH during cultivation of the isolate SS3 in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C



รูปที่ 6 การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก, กิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthetase (ALAS) และเอนไซม์ ALA dehydratase (ALAD) ระหว่างการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ SS3 ในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37°ซ

Fig. 6 5-Aminolevulinic acid (ALA) production, activity of enzyme ALA synthetase (ALAS) and ALA dehydratase (ALAD) during cultivation of the isolate SS3 in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

ALA dehydratase เพิ่มขึ้นเป็น 8.8 และ 160 U/mg protein ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ ALA synthetase เร่งปฏิกิริยาในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกและเปลี่ยนเป็นสารประกอบเตตราไพโรลอย่างต่อเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ ALA dehydratase ข้อสังเกตคือ กิจกรรมของเอนไซม์ ALA dehydratase ลดลงที่เวลา 60 ชั่วโมง สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกที่เวลาเดียวกัน

2. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่คัดเลือกได้

2.1 การจำแนกในระดับวงศ์ (Family)

ผลการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้ใน Sulfide medium และ Thiosulfate medium ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง พบว่าเชื้อไม่เจริญเนื่องจากไม่สามารถใช้ซัลไฟด์และไธโอซัลเฟตเป็นตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับการสังเคราะห์แสง แสดงว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้เป็นพวก purple non-sulfur กลุ่ม Anoxygenic อยู่ในวงศ์ Rhodospirillaceae (Buchanan *et al*., 1974; Staley *et al*., 1989)

2.2 การจำแนกในระดับสกุล (Genus) **และชนิด** (Species)

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์ SS3 ที่คัดเลือกได้ มาจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา (ตารางที่ 3) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ SS3 ติดสีแกรมลบ มีรูปไข่ ขนาด 0.95×1.42 μm เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างเมือก ไม่สามารถย่อยเจลาติน จากการศึกษาความต้องการวิตามิน พบว่า ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง เชื้อไม่เจริญได้ในอาหารที่ปราศจากไบโอตินและวิตามินบี 12 และเจริญได้เล็กน้อยในสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมกรดพาราอะมิโนเบนโซอิกและไทอามิน และเจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีการเติมกรดนิโคตินิค แสดงว่าต้องการวิตามินบี 12 และไบโอตินในการเจริญแต่ไม่ต้องการกรดนิโคตินิค มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ และคาโรทีนอยด์ ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 378, 478, 515, 590, 805 และ 860 นาโนเมตร (รูปที่ 7)

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความต้องการวิตามินของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์ SS3

Table 3 Taxonomic characteristics and requirement of vitamins of the selected halotolerant photosynthetic bacterial isolate SS3

Gram	Negative
Cell shape	Ovoid
Cell size	0.9 x 1.42 μm
Cell motility	+
Slime formation	-
Hydrolyzed gelatin	-
Vitamin Requirement*	
- biotin	+
- vitamin B_{12}	+
- nicotinic acid	-
-ρ-aminobenzoic acid	±
-thiamin	±
Photopigment	Bacteriochlorophyll a
Spectrum absorption	378, 478, 515, 590, 805 and 860 nm
Anaerobic growth in the light	+ (brownish red)
Aerobic growth in the dark	+ (red)

* + = no growth when no addition vitamin after incubation for 96 h

± = slight growth (0.1<OD<0.2)

− = good growth (OD≥0.2)

รูปที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงสารละลายเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม สายพันธุ์ SS3

Fig. 7 Absorption spectrum of whole cell suspention of the halotolerant photosynthetic bacterial isolate SS3

เมื่อเจริญในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง เชื้อมีสีน้ำตาลแดง ส่วนการเจริญในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสงเชื้อมีสีแดง ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของ *Rhodobacter* sp. โดย Imhoff และ คณะ (1984) รายงานว่า *Rhodobacter* sp. มีรูปร่างรูปไข่หรือรูปท่อน ขนาด 0.5 –1.2 μm ผลิตหรือไม่ผลิตเมือก เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 376-378, 450-455, 470-480, 508-513, 590-592, 802-805 และ 860-863 นาโนเมตร

เมื่อทดสอบการใช้สารอาหารของเชื้อ (ตารางที่ 4) พบว่าสายพันธุ์ SS3 เจริญได้ดีในสูตรอาหารที่เติมไพรูเวท อะซิเตท กลูโคส ฟรุคโทส โพรพิโอเนต แลคเทต ซัคซิเนต มาเลต กลูตาเมต และเอทธานอล และไม่เจริญในสูตรอาหารที่เติม กลีเซอรอล ซอร์บิทอล เบนโซเอต ซิเทรต แมนโนส แมนิทอล และทาเทรต จากการเปรียบเทียบการใช้สารอาหารของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง พบว่าสายพันธุ์ SS3 สามารถใช้สารอาหารสอดคล้องกับการใช้สารอาหารของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* (Staley *et al*., 1989) ดังนั้น จึงสรุปว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *Rhodobacter capsulatus* SS3

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการใช้สารอาหารของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์ SS3 ที่คัดเลือกได้กับเชื้อ *Rhodobacter capsulatus*

Table 4 Comparison on utilization of various compounds as carbon sources or electron donor of the halotolerant photosynthetic bacterial isolate SS3 cultivated under anaerobic-light condition and *Rhodobacter capsulatus*

Carbon source or electron donor	Isolate SS3	*Rhodobacter capsulatus*[1] (Staley *et al*., 1989)
Pyruvate	+++	+
Acetate	++	+
Glycerol	-	-
Glucose	++	+
Sorbitol	-	±
Fructose	++	+
Propionate	++	+
Lactate	++	+
Benzoate	-	-
Succinate	++	+
Citrate	-	±
Malate	++	+
Glutamate	++	+
Mannose	-	-
Methanol	-	-
Ethanol	++	+
Mannitol	-	±
Tartrate	-	-

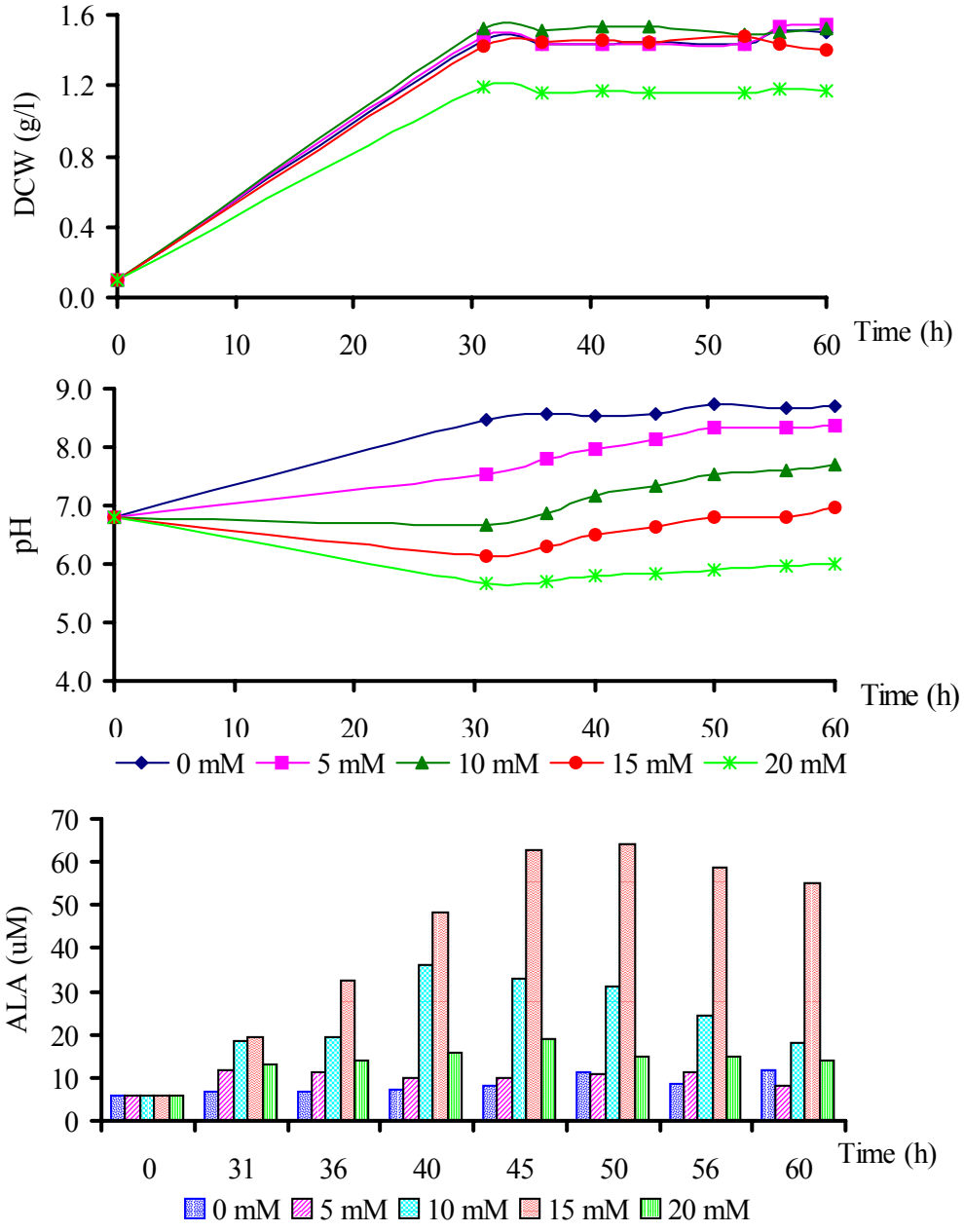
(+++) = OD>0.2 after incubation for 24 h, (++) = OD>0.2 after incubation for 72 h

(-) = no growth, (±) = substrate utilized by some strains

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก

3.1 ผลของความเข้มข้นของกรดลีวูลินิก

จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ในอาหารกลูตาเมต-มาเลต ที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีการเติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 มิลลิโมลาร์ หลังการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเริ่มเข้าสู่สภาวะการเจริญค่อนข้างคงที่ โดยมีรายงานของ Sasaki และคณะ (1987) ว่าการเติมกรดลีวูลินิกในระยะที่เชื้อมีการเจริญจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมเมทาบอลิซึมของเชื้อในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก และส่งผลให้เชื้อมีการเจริญช้าลงและหลั่งกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกออกมาภายนอกเซลล์มากขึ้น ผลการทดลองโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่มีการเติมกรดลีวูลินิก) (รูปที่ 8) พบว่าการเติมกรดลีวูลินิกที่ระดับความเข้มข้น 5,10 และ 15 มิลลิโมลาร์ให้มวลชีวภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) กับชุดควบคุม โดยให้มวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 1.50, 1.48, 1.53 และ 1.51 กรัมต่อลิตร การเติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีผลให้การเจริญของเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (มวลชีวภาพเท่ากับ 1.19 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นผลจากการที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำกว่า 6 เกิดสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ปริมาณมวลชีวภาพจึงน้อยกว่าเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีการเติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้นต่ำกว่า (5-15 มิลลิโมลาร์) ซึ่งการเติมที่ระดับ 10 มิลลิโมลาร์เริ่มมีผลทำให้พีเอชลดลงหลังการเลี้ยงเชื้อประมาณ 30 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เชื้อเมตาบอไลซ์กรดลีวูลินิกไปเป็นอะซิเตท โพรพิโอเนต (Okuyama *et al*., 1988) และมีรายงานว่ากรดลีวูลินิกเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์เตตราไพโรลรวมทั้งไซโตโครมที่ใช้ในการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Sasaki *et al*., 1987) ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์แสงของเชื้อ ดังนั้นการเติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เชื้อจึงมีการเจริญลดลงมาก



รูปที่ 8 ผลของความเข้มข้นกรดลีวูลินิกต่อการเจริญ พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37°ซ

Fig. 8 Effect of levulinic acid (LA) concentration on growth, pH and ALA production from *Rhodobacter capsulatus* SS3 under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

สำหรับผลของการเติมกรดลีวูลินิกต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของ *Rhodobacter capsulatus* SS3 พบว่าที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ เชื้อผลิต ALA ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม (ไม่เติมกรดลีวูลินิก) โดยที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุดเท่ากับ 61 ไมโครโมลาร์ รองลงมาที่ความเข้มข้น 10, 5 และ 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 43, 25 และ 15 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับส่วนชุดควบคุมมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้ 13 ไมโครโมลาร์ การที่เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้น้อยที่ความเข้มข้นของกรดลีวูลินิกต่ำ (5 และ 10 มิลลิโมลาร์) อาจเป็นเพราะเชื้อใช้กรดลีวูลินิกเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญด้วย จึงเหลือปริมาณกรดลีวูลินิกเล็กน้อยซึ่งอาจจะยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase ได้เพียงบางส่วน ทำให้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกถูกเปลี่ยนไปเป็นสารเตตราไพโรลแทนการหลั่งออกมานอกเซลล์ การเติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้นสูง (20 มิลลิโมลาร์) ไม่สามารถส่งเสริมให้เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดสูง (พีเอชต่ำ) ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ดังนั้นปริมาณเชื้อจึงลดลงส่งผลให้ปริมาณการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกลดลงด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Sasaki และคณะ (1991) ที่พบว่า อาหารที่เติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้นสูง (30 มิลลิโมลาร์) ทำให้การเจริญของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ลดลงและไม่มีการหลั่ง ALA ออกนอกเซลล์

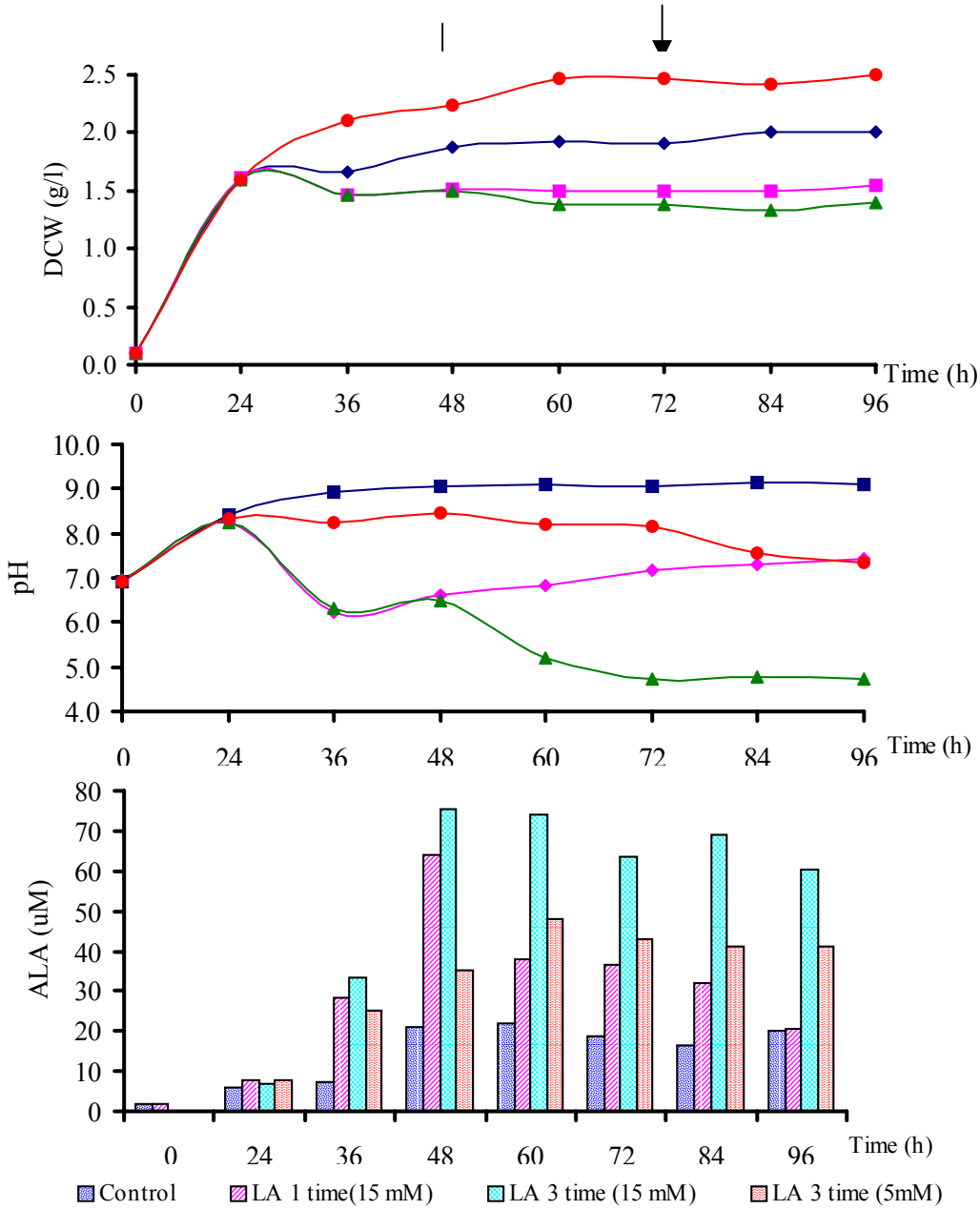
ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดลีวูลินิกที่เติม คือ 15 มิลลิโมลาร์ซึ่งให้มวลชีวภาพและปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกสูงสุด มีค่าเท่ากับ 1.53 กรัมต่อลิตร และ 61 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

3.2 ผลของจำนวนครั้งในการเติมกรดลีวูลินิก

ผลของการเติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ 1 ครั้ง ที่ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการเติมกรดลีวูลินิกความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ 3 ครั้ง ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ 3 ครั้งที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในอาหาร กลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ในการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ภายใต้สภาวะมี

อากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 9) พบว่าการเติมกรดลีวูลินิก 3 ครั้งๆ ละ 5 มิลลิโมลาร์เชื้อมีการเจริญได้สูงสุดโดยให้มวลชีวภาพเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าชุดควบคุม (1.9 กรัมต่อลิตร) และชุดที่มีการเติมกรดลีวูลินิก 1 ครั้ง (15 มิลลิโมลาร์) และ ชุดที่มีการเติมกรดลีวูลินิก 3 ครั้งๆ ละ 15 มิลลิโมลาร์ โดยให้มวลชีวภาพเท่ากับ 1.47 และ 1.45 กรัมต่อลิตรตามลำดับ การเติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้นต่ำ (5 มิลลิโมลาร์) ทำให้พีเอชลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 8.16 และ 9.06 ตามลำดับ ซึ่งอาจจะมาจากการที่เชื้อสามารถเปลี่ยนกรดลีวูลินิกเป็นอะซิเตท โพรพิโอเนต (Okuyama *et al*., 1988) ส่วนการเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 1 ครั้งที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าหลังจากนั้นอีก 12 ชั่วโมง (36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ) พีเอชมีค่าลดลงจาก 8.2 เป็น 6.5 ที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (6.8-7.0) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง และเมื่อเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 3 ครั้ง ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีผลให้พีเอชลดลงมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเติมในครั้งที่ 2 และ 3 ซึ่งพีเอชมีค่าเท่ากับ 5.3 และ 4.8 ดังนั้นพีเอชในช่วงนี้จึงมีผลให้การเจริญของเชื้อลดลง แต่มีรายงานว่ากรดลีวูลินิกที่เติมในอาหารจะอยู่ในรูปที่แตกตัวและในรูปที่ไม่แตกตัว ซึ่งจะอยู่ในรูปใดมากกว่ากันนั้นขึ้นอยู่กับพีเอชในอาหาร โดยกรดลีวูลินิกที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวสามารถยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase ส่งผลให้มีการผลิต ALA มากขึ้น หากอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชต่ำ (4-5) โดยค่า pKa ของกรดลีวูลินิกมีค่าประมาณ 4 ดังนั้น กรดลีวูลินิกจะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวและสามารถยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase ได้ดีทำให้มีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกปริมาณเพิ่มขึ้น (Sasaki *et al*., 1997)

การเติมกรดลีวูลินิก 3 ครั้งๆ ละ 15 มิลลิโมลาร์ เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกมากกว่าการเติม 1 ครั้ง (15 มิลลิโมลาร์) และ 3 ครั้งๆ ละ 5 มิลลิโมลาร์ รวมทั้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยได้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเท่ากับ 74, 61, 53 และ 20 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ นอกจากนี้การเติมกรดลีวูลินิก 1 ครั้ง (15 มิลลิโมลาร์) มีผลให้เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีปริมาณลดลง อาจเนื่องจากเชื้อมีการใช้กรดลีวูลินิกเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ปริมาณกรดลีวูลินิกลดลงและกรดลีวูลินิกที่เหลือจะไปยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์



รูปที่ 9 ผลของจำนวนครั้งในการกรดลีวูลินิกต่อการเจริญ พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศ เล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37°ซ

Fig. 9 Effect of repeated addition of levulinic acid (LA) on growth, pH and ALA production from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

ALA dehydratase ไม่เพียงพอที่จะเปลี่ยน ALA ไปเป็นสารประกอบเตตราไพโรล ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์เอนไซม์ (รูปที่ 10) โดยพบว่าหลังจากเติมกรดลีวูลินิก 12 ชั่วโมง (ที่ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ) กิจกรรมของเอนไซม์ ALA dehydratase ลดลง หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์กลับเพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง เป็นผลให้การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้นสูงถึง 64 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้นมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

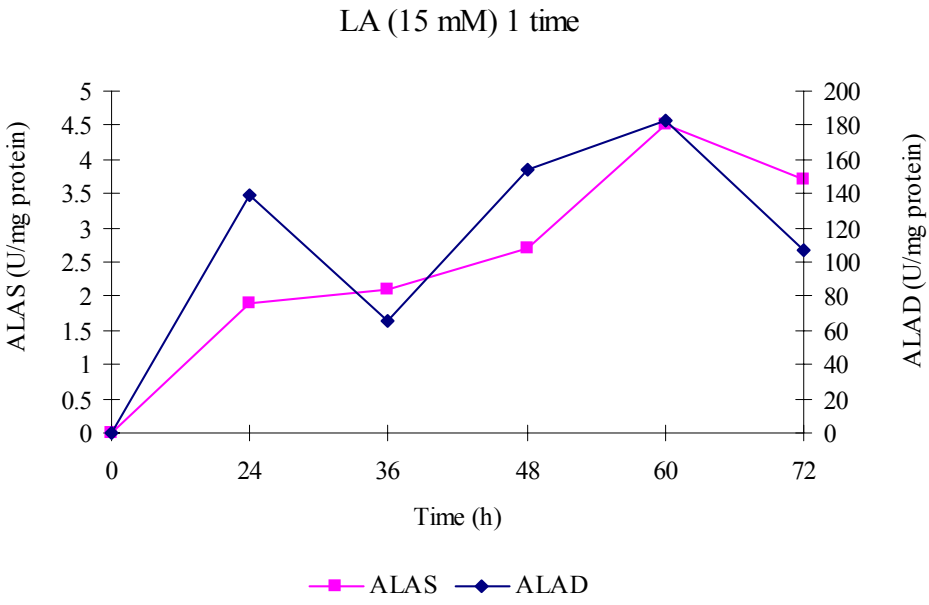
ส่วนการเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALA dehydratase ลดลงหลังจากเติมกรดลีวูลินิกแต่ละครั้ง 12 ชั่วโมง แต่เอนไซม์ ALA synthetase กลับเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการควบคุมแบบย้อนกลับของสารประกอบเตตราไพโรลที่เกิดขึ้น และมีค่ากิจกรรมสูงสุด (3.6 U/mg protein) ที่เวลา 36 ชั่วโมง หลังการเลี้ยงเชื้อ และการเติมกรดลีวูลินิก ครั้งที่ 2 ที่ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALA dehydratase และเอนไซม์ ALA synthetase ลดลงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกยังคงเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย มีค่าเท่ากับ 72 ไมโครโมลาร์และลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง

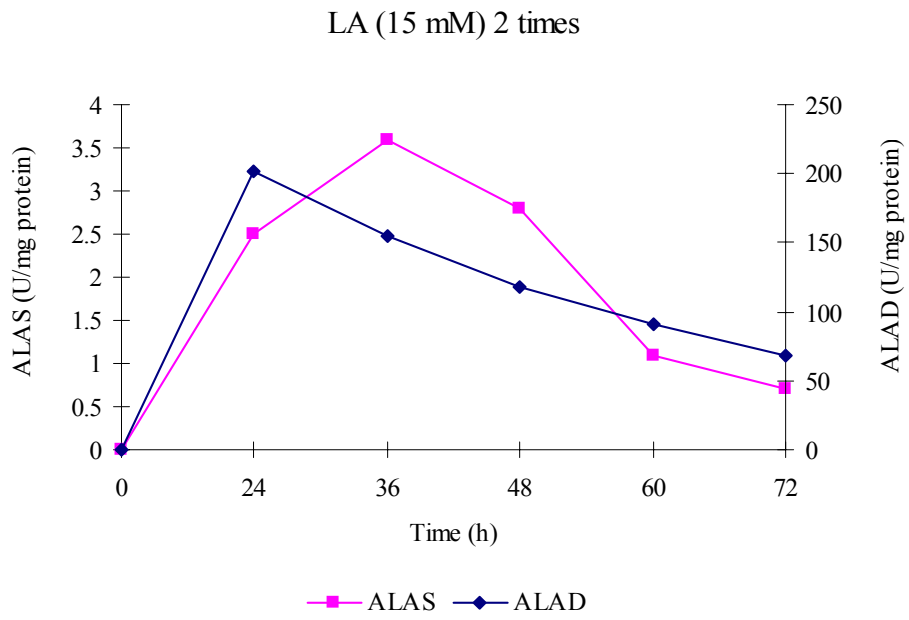
จากผลการทดลองสรุปได้ว่าควรเลือกการเติมกรดลีวูลินิก 2 ครั้งๆ ละ 15 มิลลิโมลาร์ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากในการเติมครั้งที่ 3 การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกลดลง ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองต้นทุนในการผลิต ดังนั้นการเติมกรดลีวูลินิก 2 ครั้งจึงเหมาะสมและให้ผลผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกสูงสุดและเป็นวิธีการควบคุมเอนไซม์ ALA dehydratase ให้อยู่ในระดับต่ำทำให้การเปลี่ยนกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกไปเป็นสารประกอบเตตราไพโรลลดลง

3.3 ผลของการเติมสารตั้งต้นในวิถี C_5

3.3.1 ผลของการเติมกลูตาเมต

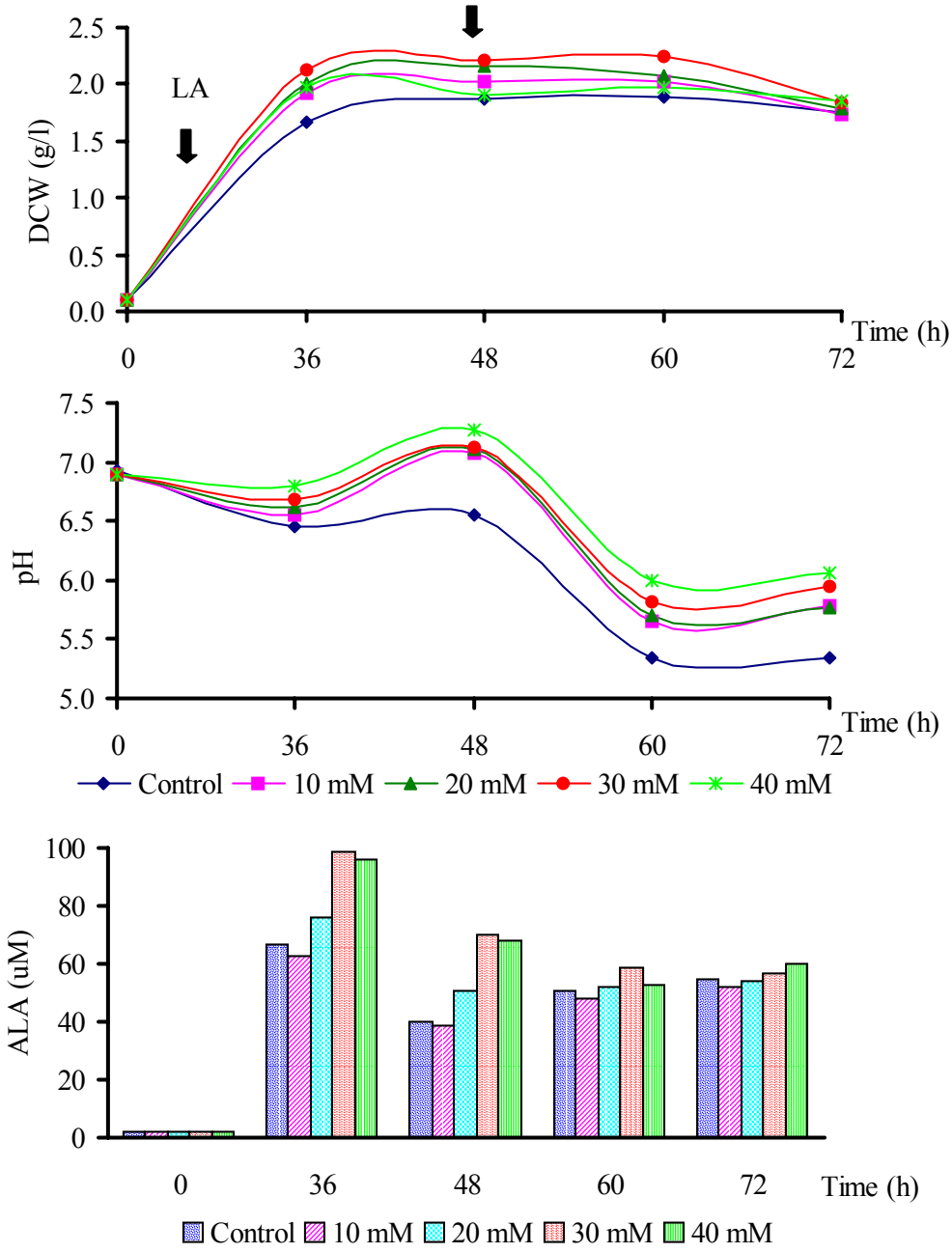
จากการศึกษาผลการเติมกลูตาเมตที่ความเข้มข้นต่างๆ (10-40 mM) ในการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม *Rhodobacter capsulatus* SS3 ในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% และเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) (รูปที่ 11) พบว่าการ





รูปที่ 10 **ผลของการเติมกรดลีวูลินิกต่อกิจกรรมของเอนไซม์** ALAS **และ** ALAD **ของเชื้อ** *Rhodobacter capsulatus* SS3 **ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ** 3% **ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง** (3,000 **ลักซ์**) **อุณหภูมิ** 37 °**ซ**

Fig.10 Effect of levulinic acid supplementstion on activity of enzyme ALA synthetase (ALAS) and ALA dehydratase (ALAD) from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM +3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C



รูปที่ 11 ผลของกลูตาเมตต่อการเจริญ, พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่ เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 °ซ

Fig. 11 Effect of glutamate on growth, pH and ALA production from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

เพิ่มกลูตาเมตมีผลต่อเพิ่มการเจริญของเชื้อเพียงเล็กน้อย โดยปริมาณมวลชีวภาพที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (1.8-2.2 กรัมต่อลิตร) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในอาหารกลูตาเมต-มาเลต มีปริมาณกลูตาเมตอยู่แล้ว 3.8 กรัมต่อลิตร (20 mM) และเมื่อเพิ่มกลูตาเมต 10-30 มิลลิโมลาร์จะให้มวลชีวภาพสูงกว่าชุดควบคุม และเชื้อให้มวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 2.24 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมกลูตาเมตที่ 30 มิลลิโมลาร์ แต่เมื่อเติมกลูตาเมต 40 มิลลิโมลาร์ พบว่าเชื้อมีการเจริญลดลงโดยให้มวลชีวภาพเท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ปริมาณกลูตาเมตที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมกับที่เติมลงไปทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกลูตาเมตความเข้มข้นสูงเกินความต้องการของเชื้อจึงทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดี

สำหรับการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลูตาเมต พีเอชมีค่าต่ำกว่าในชุดที่มีการเติมกลูตาเมต และการเพิ่มกลูตาเมต 40 มิลลิโมลาร์ พีเอชมีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.27 ที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จะเห็นว่าปริมาณกลูตาเมตที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อมีการสลายกลูตาเมตและปลดปล่อยสารที่เป็นด่างออกมา แต่ในการทดลองมีการเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง โดยเฉพาะการเติมกรดลีวูลินิกครั้งที่ 2 ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าหลังการเติมกรด 12 ชั่วโมง (60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ) ค่าพีเอชลดลงมาก (พีเอช 5.3) และความเข้มข้นกรดเพิ่มขึ้นจนมีผลให้เชื้อเจริญลดลง อย่างไรก็ตาม การเติมกลูตาเมต 30 มิลลิโมลาร์ มีผลให้เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งได้เท่ากับ 99 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 2.75 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเพิ่มกลูตาเมต ให้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเท่ากับ 67 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 1.86 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง ส่วนการเติมกลูตาเมต 40 มิลลิโมลาร์ เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เท่ากับ 96 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 2.66 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง

การเติมกลูตาเมตมีผลให้เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากกลูตาเมตสามารถเปลี่ยนเป็น α-ketoglutarate โดยอาศัยปฏิกิริยา transaminases และในวัฏจักร TCA α-ketoglutarate ก็จะเปลี่ยนเป็น succinyl CoA และเมื่อรวมกับไกลซีน เปลี่ยน

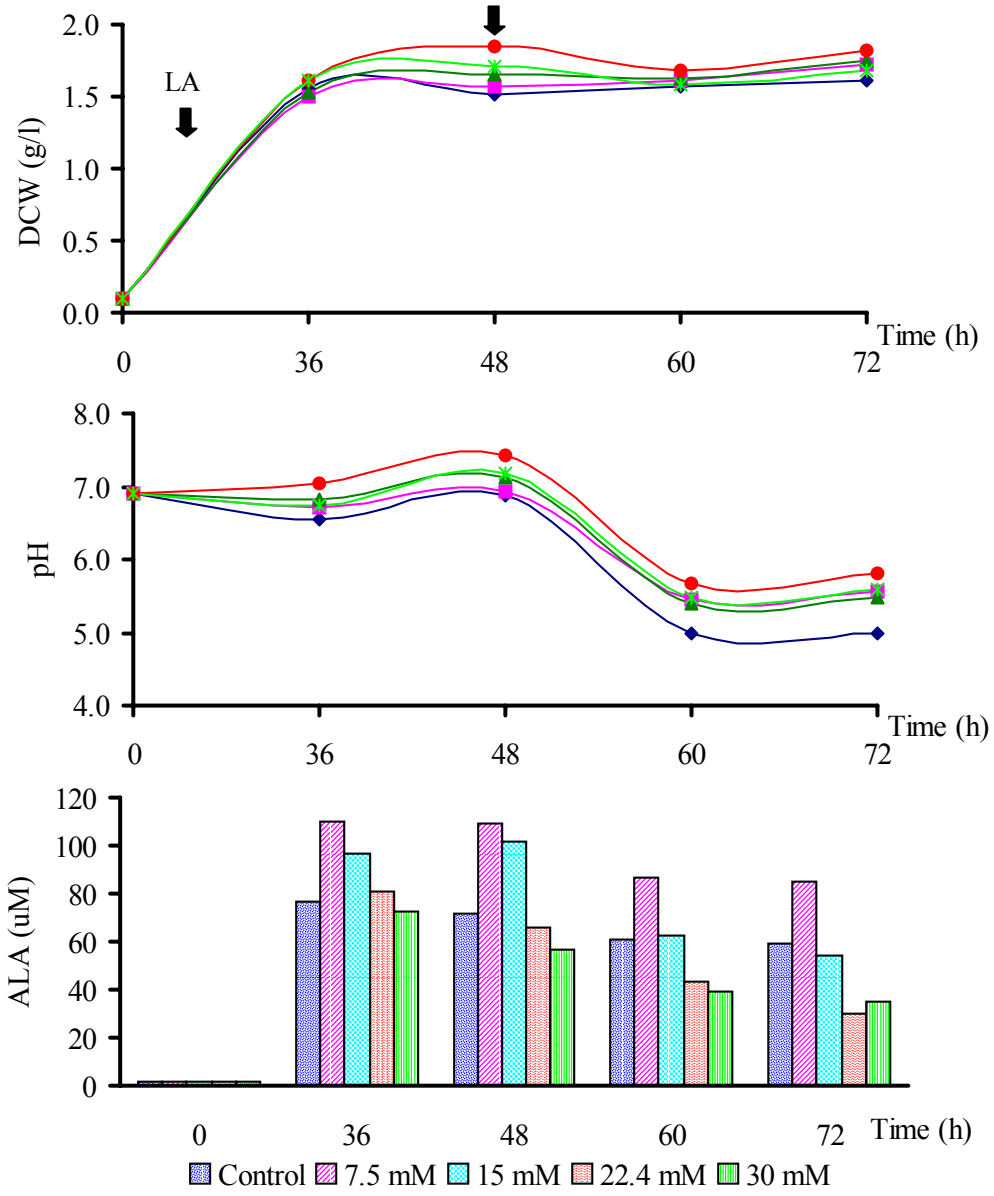
เป็นกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก นอกจากนี้มีรายงานว่า เชื้อบางชนิดสามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ได้ทั้ง 2 วิถี คือ ใช้ กลูตาเมต (วิถี C_5) และไกลซีน + ซัคซิเนต (วิถี C_4) เป็นสารตั้งต้น เช่นเชื้อ *Propionibacterium shermanii* แต่จะไปทางวิถีใดขึ้นอยู่กับว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดใดมากกว่ากันระหว่างเอนไซม์ ALA synthetase หรือเอนไซม์ glutamyl-tRNA (Iida and Kajiwara, 2000)

ดังนั้นการเติมกลูตาเมต 30 มิลลิโมลาร์ จึงเหมาะสมต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกมากที่สุด โดยใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อเพียง 36 ชั่วโมงและมีอัตราการผลิตเท่ากับ 2.75 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง

3.3.2 ผลของการเติมกรดมาลิก

ผลของการเติมกรดมาลิกที่ 7.5, 15, 22.5 และ 30 มิลลิโมลาร์ (1, 2, 3 และ 4 กรัมต่อลิตร) ในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% เพิ่มกลูตาเมต 30 มิลลิโมลาร์และเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 12) พบว่าการเพิ่มกรดมาลิกที่ทุกความเข้มข้น เชื้อมีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การเติมกรดมาลิกเชื้อมีการเจริญดีกว่าชุดควบคุม (ไม่มีการเพิ่มกรดมาลิก) โดยเชื้อมีการเจริญสูงสุด 1.84 กรัมต่อลิตรเมื่อเพิ่มกรดมาลิกเข้มข้น 22.5 มิลลิโมลาร์ โดยชุดควบคุมให้มวลชีวภาพเท่ากับ 1.62 กรัมต่อลิตร กรดมาลิกที่เติมเชื้อสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้อีก แม้ว่าในอาหารชุดควบคุมจะมีกรดมาลิกอยู่แล้ว 20 มิลลิโมลาร์ (2.7 กรัมต่อลิตร) ส่วนการเติมกรดลีวูลินิกมีผลให้พีเอชลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเติมกรดลีวูลินิกในครั้งที่ 2 ทำให้ช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อ เชื้อมีการเจริญคงที่

ส่วนผลของกรดมาลิกต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการเพิ่มกรดมาลิก 7.5 มิลลิโมลาร์ เชื้อมีการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิกสูงสุด 110 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 3.05 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง รองลงมาคือ การเพิ่มกรดมาลิก 15 มิลลิโมลาร์ให้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก 102 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 2.12 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง ส่วนชุดควบคุม (ไม่มีการเพิ่มกรดมาลิก) ผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเท่ากับ 82 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 2.14



รูปที่ 12 ผลของกรดมาลิกต่อการเจริญ, พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่ เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 °ซ

Fig. 12 Effect of malic acid on growth, pH and ALA production from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง แสดงว่าเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ไม่ต้องการกรดมาลิกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก แต่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเท่านั้น การที่เชื้อสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกโดยใช้กรดมาลิกนั้นเกิดขึ้นเฉพาะแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น มีรายงานว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีเขียว (green photosynthetic bacteria) ซึ่งเป็นพวกที่ขาดเอนไซม์ ไรบูโลส ไดฟอสเฟตคาร์บอกซิเลส โดยใช้วัฏจักรรีดักทีฟคาร์บอกซิลิกแอสิด ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (Moat and Foster, 1988)

ดังนั้นขั้นตอนการสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก คือ malate $\rightarrow$ fumarate $\rightarrow$ succinate $\rightarrow$ ALA จากผลการทดลองข้างต้นซึ่งใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วง (purple photosynthetic bacteria) ในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจึงเป็นไปได้ที่เชื้อไม่ใช้วัฏจักรรีดักทีฟ คาร์บอกซิลิก แอสิดในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

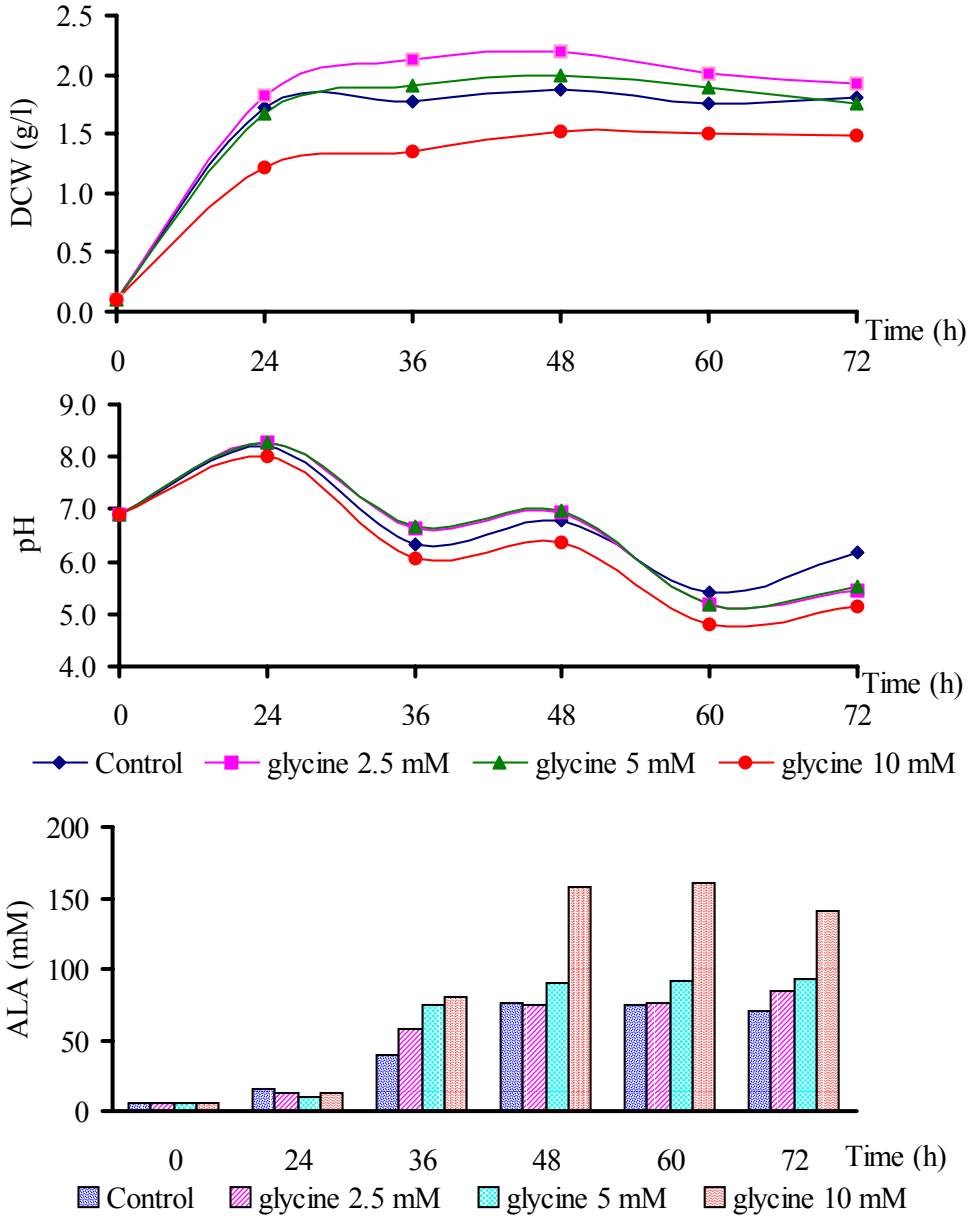
จากผลการทดลองซึ่งบ่งชี้ว่าการเติมกรดมาลิกไม่สามารถทำให้เชื้อเพิ่มการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงไม่มีการเติมกรดมาลิกเพิ่มเติม

3.4 ผลของการเติมสารตั้งต้นในวิถี C_4

จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% เติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อและมีการเติมไกลซีนที่ความเข้มข้น 2.5-40 มิลลิโมลาร์และซัคซิเนตที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4.1 ผลของการเติมไกลซีน

จากการเติมเฉพาะไกลซีน 2.5-40 มิลลิโมลาร์ พบว่าเชื้อมีการเจริญในอาหารที่เติมไกลซีน 2.5, 5.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ เท่านั้น (รูปที่ 13) โดยให้มวลชีวภาพเท่ากับ 2.13, 1.91 และ 1.52 กรัมต่อลิตร และผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เท่ากับ 81, 99 และ 170 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมากกว่าปริมาณมวลชีวภาพและกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกที่ได้จากชุดควบคุม



รูปที่ 13 ผลของไกลซีนต่อการเจริญ พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 °ซ

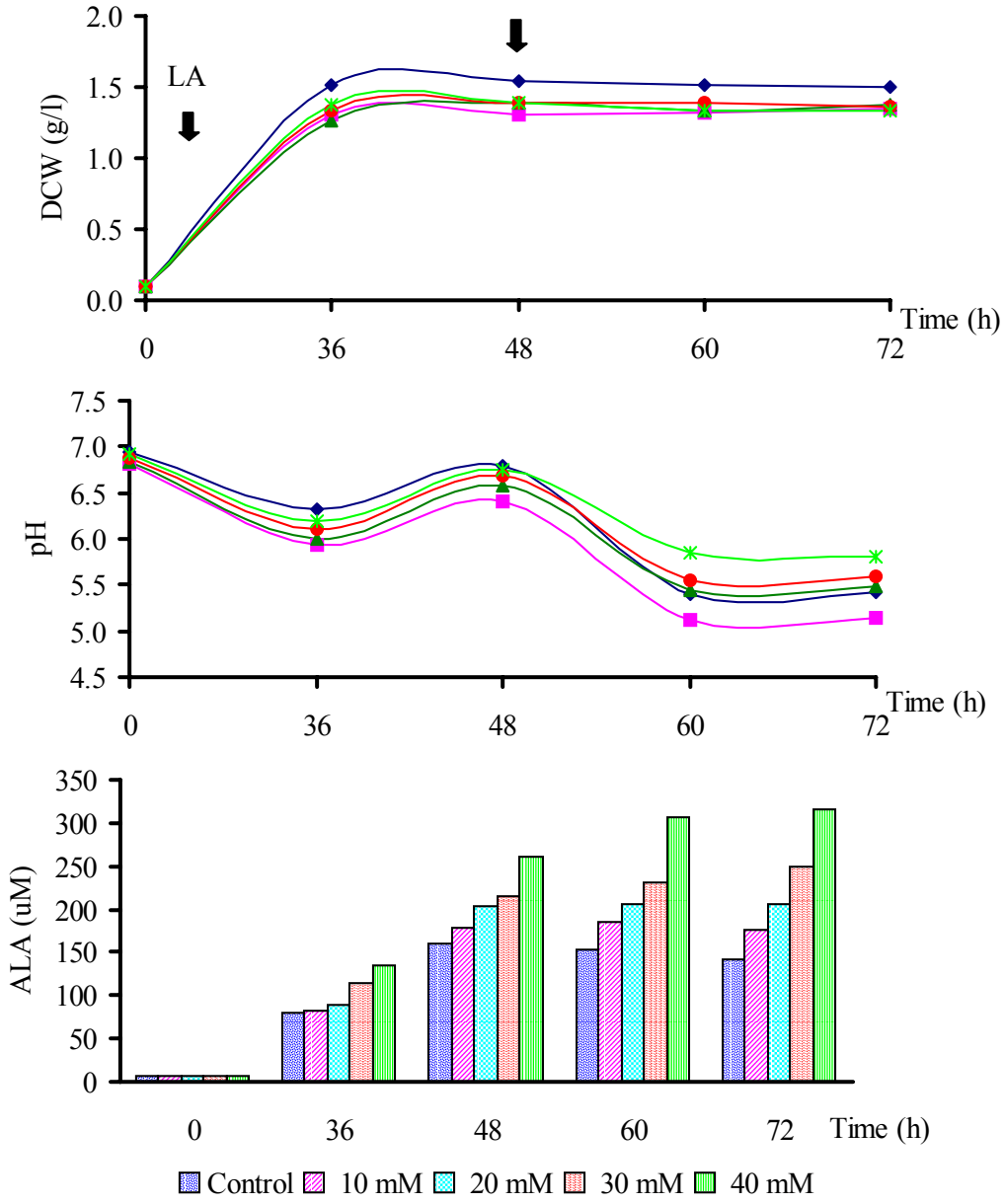
Fig. 13 Effect of glycine concentration on growth, pH and ALA production from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°

(1.88 กรัมต่อลิตร และ 75 ไมโครโมลาร์) จากผลการทดลองที่ความเข้มข้นของไกลซีน 20-40 มิลลิโมลาร์ พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ มีรายงานว่าไกลซีนสามารถยับยั้งการสังเคราะห์พอร์ไพริน นอกจากนี้ไกลซีนยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ glutathione ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ซัลไฟดริลของเอนไซม์ ALA synthetase หรือเอนไซม์ที่มีซัลไฟด์เป็นองค์ประกอบ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (Neuberger, 1961) หรือสูญเสียกิจกรรมส่งผลให้การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกลดลงหรือไม่มีการผลิต ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของไกลซีนเพื่อเติมเป็นสารตั้งต้น คือ 10 มิลลิโมลาร์

3.4.2 ผลของการเติมซัคซิเนต

จากการศึกษาผลของการเติมซัคซิเนตในช่วงความเข้มข้น 10-40 มิลลิโมลาร์และเติมไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 14) พบว่าการเติมซัคซิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลให้การเจริญของเชื้อลดลง โดยให้ค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 1.35 - 1.40 กรัมต่อลิตร เทียบกับผลจากชุดควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.6 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซัคซิเนตที่เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดเท่ากับ 348 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 4.83 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของซัคซิเนต 40 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้ไกลซีนและซัคซิเนตเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกทางวิถี C_4 (Shemin pathway) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมสารตั้งต้นในวิถี C_5 คือกลูตาเมต พบว่าการเติมสารตั้งต้นในวิถี C_4 ส่งเสริมให้เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้มากกว่า 3 เท่า ดังนั้นหากมีการเติมสารตั้งต้นในวิถี C_4 อย่างเพียงพอ เชื้อจะสามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้ในปริมาณมาก แต่ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่ได้มีปริมาณต่ำกว่าค่าที่ได้จากเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมไกลซีน 30 มิลลิโมลต่อลิตรและซัคซิเนต 30 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงถึง 2 มิลลิโมลต่อลิตร (Sasaki *et al*., 1987) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียและสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง

ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่าเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้ดี เมื่อเติมสารตั้งต้นของวิถี C_4 และความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ การเติมไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์และซัคซิเนต 40 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะนำสารตั้งต้น



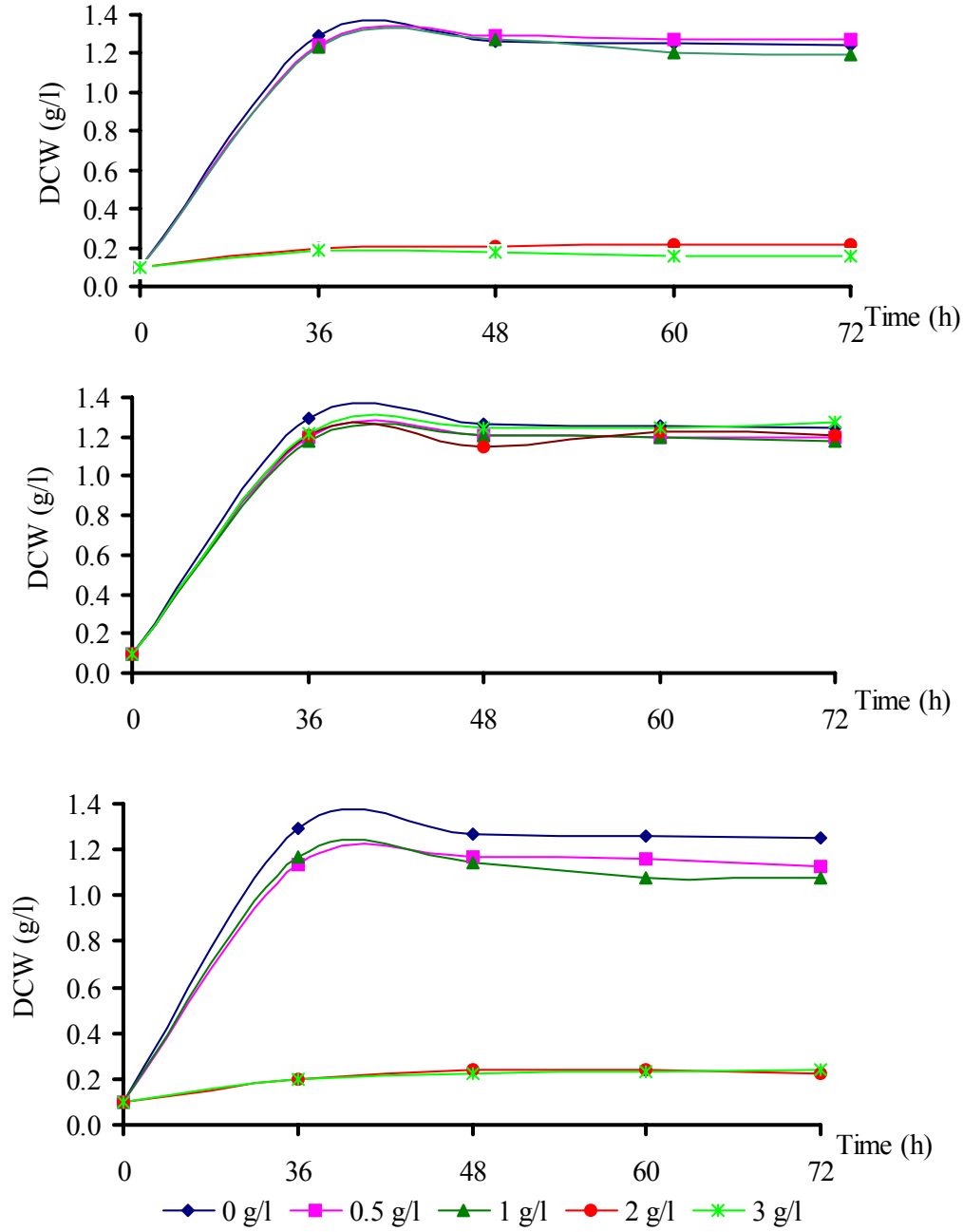
รูปที่ 14 ผลของซัคซิเนตต่อการเจริญ พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 °ซ

Fig. 14 Effect of succinate on growth, pH and ALA production from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาปัจจัยในการเพิ่มการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกต่อไป

3.5 ผลของชนิดและความเข้มข้นของกรดไขมันระเหย

จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ในอาหารกลูตาเมต-มาเลต ที่มีเกลือ 3% เติมไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์, ซัคซิเนต 40 มิลลิโมลาร์, กรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง และเติมกรดไขมันระเหยแต่ละชนิด (กรดอะซิติก, กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก) ที่ความเข้มข้น 0.5-3 กรัมต่อลิตรในสภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) (รูปที่ 15) พบว่าผลของกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.5-3 กรัมต่อลิตร เชื้อให้มวลชีวภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) 1.2-1.3 กรัมต่อลิตร แต่มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุม (1.4 กรัมต่อลิตร) ส่วนการเติมกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร เชื้อให้มวลชีวภาพเท่ากับ 1.21 และ 1.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม (1.3 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 2-3 กรัมต่อลิตร เชื้อมีการเจริญเพียงเล็กน้อยเท่านั้นโดยให้มวลชีวภาพเพียง 0.1-0.2 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับกรดบิวทิริกโดยพบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรเชื้อให้มวลชีวภาพไม่แตกต่างกับชุดควบคุมโดยมีค่าเท่ากับ 1.17, 1.16 และ 1.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดบิวทิริก 2 และ 3 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อมีการเจริญเพียงเล็กน้อยเท่านั้นโดยให้มวลชีวภาพเท่ากับ 0.15 และ 0.22 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสามารถใช้กรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ สำหรับกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการเจริญของเชื้อโดยไปรบกวนการแลกเปลี่ยนประจุที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจะมีผลต่อการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์และการเมตาบอลิซึมภายในและภายนอกเซลล์ การเติมกรดโพรพิโอนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ กรดโพรพิโอนิกจะอยู่ในรูปแตกตัวและไม่แตกตัว โดยในรูปที่ไม่แตกตัวสามารถซึมเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์และเข้าไปในไซโตพลาสซึมของเชื้อ ส่วนในรูปที่แตกตัวจะให้โปรตอนทำให้เกิดความไม่สมดุลของประจุภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ดังนั้นจึงเกิดการแลกเปลี่ยนประจุเพื่อรักษาความสมดุลของเซลล์ ซึ่งจำเป็นต้องใช้พลังงานสูงโดยใช้



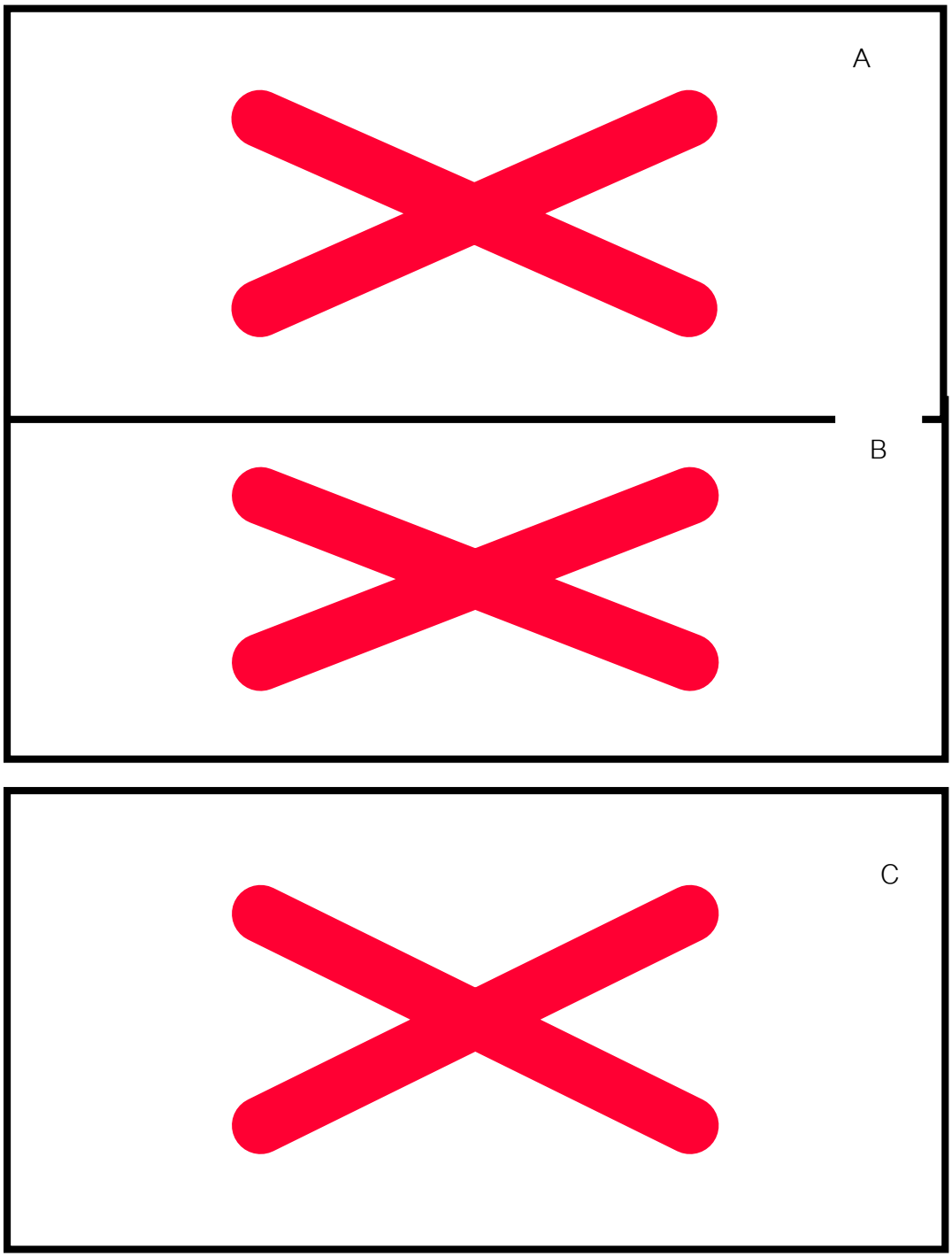
รูปที่ 15 ผลของกรดอะซิติก (A) กรดโพรพิโอนิก (B) และกรดบิวทิริก (C) ต่อการเจริญของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 °ซ

Fig. 15 Effect of acetic acid (A) propionic acid (B) and butyric acid (C) on growth of *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

H^+ - ATPase เพื่อเคลื่อนย้ายประจุออกไปนอกเซลล์ ดังนั้นพลังงานในรูป ATP ที่ใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์จึงเหลือน้อย (Gu *et al*., 1998) มีผลให้เชื้อมีการเจริญลดลง

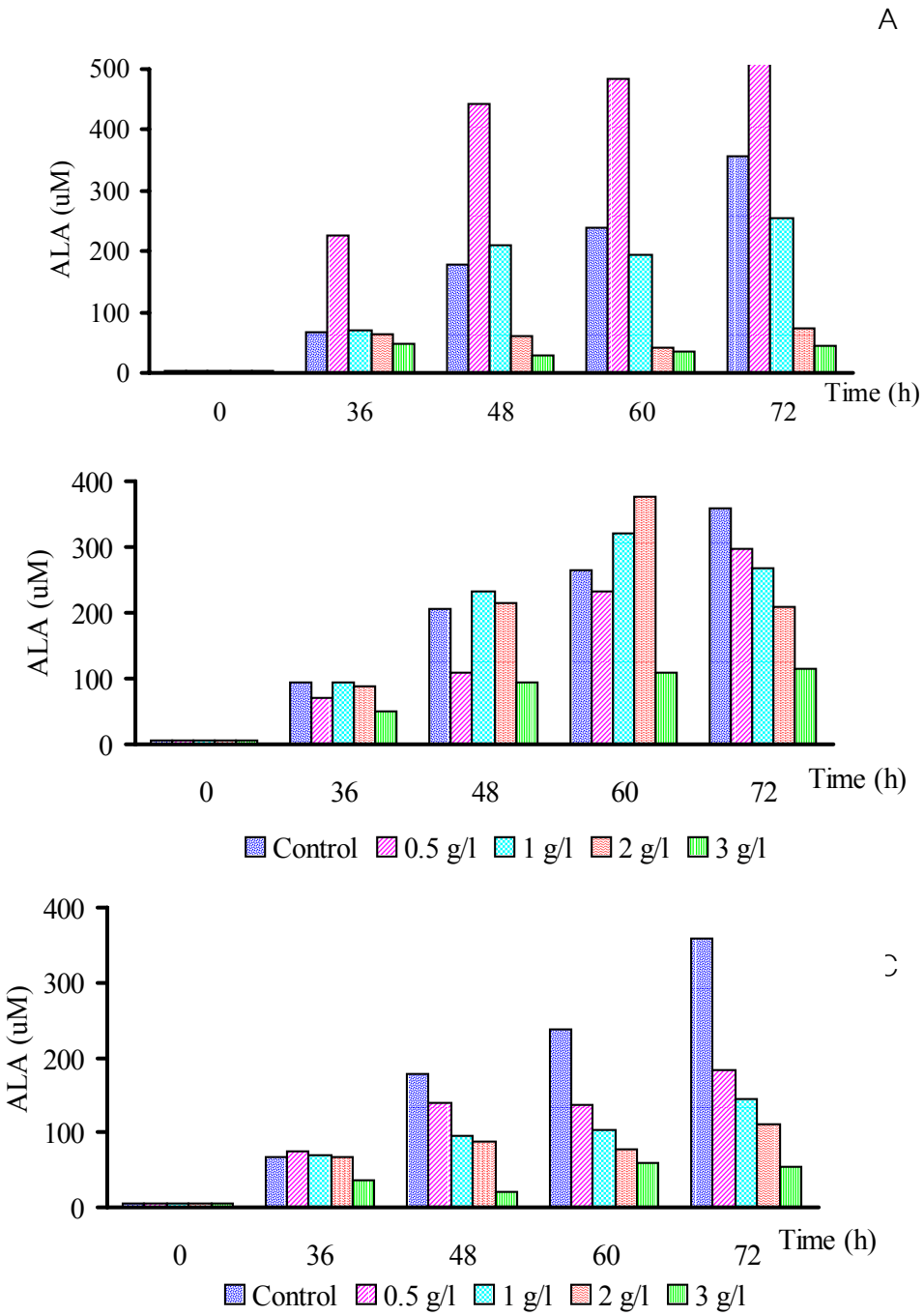
สำหรับการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 16) เมื่อเติมกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.5-3 กรัมต่อลิตร พบว่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดอะซิติกทุกความเข้มข้นมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม โดยพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ แต่ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมกรดลีวูลินิก 2 ครั้ง โดยพบว่าเมื่อเติมครั้งที่ 2 พีเอชมีค่าลดลง (จาก 7.5 เป็น 6.5) ซึ่งพีเอชในช่วงนี้มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถเจริญได้ ดังนั้นจากผลการทดลองจึงพบว่าเชื้อมีการเจริญได้ทุกความเข้มข้นของกรดอะซิติก แต่ในการเติมกรดโพรพิโอนิกและบิวทิริกที่ความเข้มข้น 0.5-3 กรัมต่อลิตร พบว่าพีเอชมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม

ผลของการเติมกรดไขมันระเหย 0.5, 1, 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (รูปที่ 17) พบว่าการเติมกรดโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ได้สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยผลิตได้เท่ากับ 514 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 7.14 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง โดยชุดควบคุมมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเท่ากับ 348 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 4.83 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง ส่วนความเข้มข้น 1-3 กรัมต่อลิตรเชื้อมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยผลิตได้เท่ากับ 254, 74 และ 46 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Sasaki และคณะ (1993) ว่าเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* สามารถใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนและเพิ่มการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกโดยผ่านทางวิถี methylmalonyl-CoA ดังนี้ propionic acid $\rightarrow$ propionyl-CoA $\rightarrow$ methylmalonyl-CoA $\rightarrow$ succinyl-CoA $\rightarrow$ ALA (Maruyama, 1979) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Tanaka และคณะ 1995 ว่า กรดโพรพิโอนิกสามารถยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydrataseจากเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ส่งผลให้มีการสะสมของกรด 5-อะมิโน



รูปที่ 16 ผลของกรดอะซิติก (A) กรดโพรพิโอนิก (B) และกรดบิวทิริก (C) ต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% จากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 °ซ

Fig. 16 Effect of acetic acid (A) propionic acid (B) and butyric acid (C) on pH of *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C



รูปที่ 17 ผลของกรดอะซิติก (A) กรดโพรพิโอนิก (B) และกรดบิวทิริก (C) ต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 °ซ

Fig. 17 Effect of acetic acid (A) propionic acid (B) and butyric acid (C) on ALA production of *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

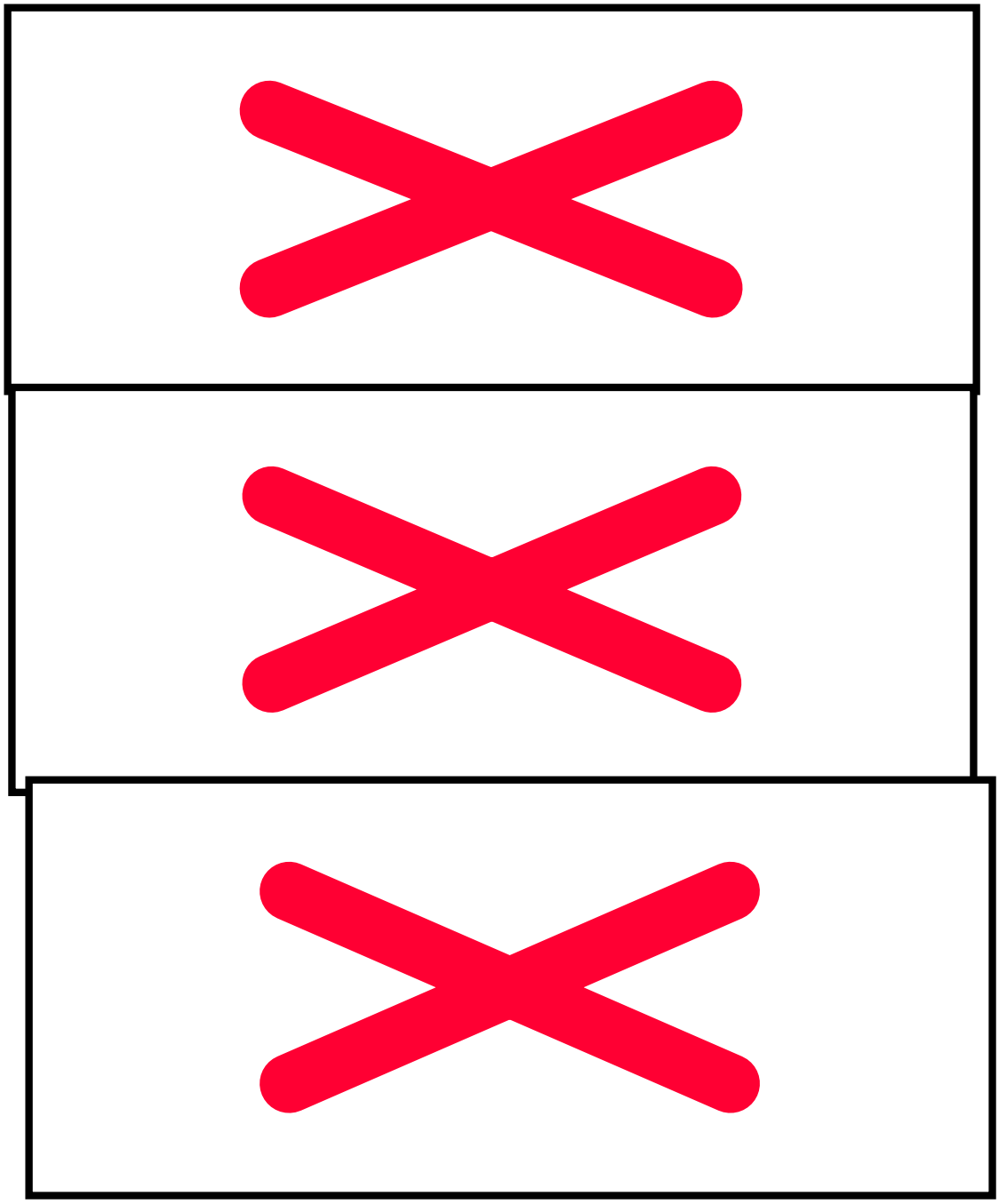
ลีวูลินิกภายนอกเซลล์มากขึ้น เช่นเดียวกับการยับยั้งแบบแข่งขันของกรดลีวูลินิก แต่ค่า Ki ของกรดโพรพิโอนิก (1.85 mM) มีค่าสูงกว่ากรดลีวูลินิก (0.48 mM) ส่วนกรดอะซิติกและบิวทิริกไม่มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase นอกจากนี้ในการเติมกรดโพรพิโอนิกร่วมกับกรดลีวูลินิกสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ALA dehydratase ลดลง 50-60% เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมกรดลีวูลินิกอย่างเดียว ส่วนการเติมกรดอะซิติก 0.5-2 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยผลิตได้เท่ากับ 298, 290, 246 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แต่การเติมกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรเชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เท่ากับ 114 ไมโครโมลาร์ สำหรับผลของการเติมกรดบิวทิริก เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้น้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยได้เท่ากับ 200, 150, 140 และ 70 ไมโครโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกสูงสุดของกรดไขมันระเหยทั้ง 3 ชนิด พบว่าการเติมกรดโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตรเชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกสูงกว่าการใช้กรดไขมันระเหยอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 514 ไมโครโมลาร์ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเลือกเติมกรดโพรพิโอนิกที่ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ได้จากการผลิตของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ที่เลี้ยงในน้ำเสียที่หมัก 7 วันภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง (5,000 ลักซ์) โดยมีอะซิเตท 1.5 กรัมต่อลิตร โพรพิโอเนต 1.6 กรัมต่อลิตร และบิวทิเรต 0.85 กรัมต่อลิตร และมีการเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 3 ครั้ง ร่วมกับไกลซีน 60 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงถึง 9.2 มิลลิโมลาร์ (Tanaka *et al*., 1994)

3.6 ผลของการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์

จากการศึกษาผลของการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 5, 10, 15 และ 20 มิลลิโมลาร์ ในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ที่เติมไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์ ซัคซิเนต 40 มิลลิโมลาร์ กรดโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตร และกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้งในการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) (รูปที่ 18) พบว่าเชื้อให้ปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ 1.50, 1.55, 1.58 และ 1.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ เชื้อให้ปริมาณมวล

ชีวภาพสูงสุด (1.58 กรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Hirayama และ Katsuta (1988) ที่พบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 5.0-20.0 มิลลิโมลาร์ ทำให้ได้ปริมาณมวล ชีวภาพของ *Rhodospirillum rubrum* G-9 BM สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากแมกนีเซียมเป็นธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชันทุกชนิด และเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิด (Lascelles, 1956) รวมทั้งมีผลต่อการรักษาความสมดุลของเยื่อหุ้มเซลล์ภายนอกในการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ (Osman and Ingram, 1985) นอกจากนี้แมกนีเซียมคลอไรด์ยังมีผลต่อการสร้างรงควัตถุทั้งนี้หากมีปริมาณสูงจะมีผลให้ปริมาณรงควัตถุลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เติมลงในอาหารเกิดการรวมตัวกับอิออนของสารอื่นกลายเป็นสารประกอบที่อยู่ในรูปที่เชื้อไม่สามารถนำไปใช้หรือยับยั้งการผลิตรงควัตถุ โดยสังเกตุเป็นผลึกเกลือสีขาวตกตะกอนอยู่ภายในนอกจากนี้กระบวนการสังเคราะห์รงควัตถุของเชื้อยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น สารตั้งต้น สารตัวกลาง (ไกลซีน โปรโตพอร์ไพริโนเจน) ซึ่งอาจมีปริมาณไม่สมดุลกับปริมาณของแมกนีเซียม สำหรับการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยงเชื้อ จะเห็นว่าพีเอชลดลงตามลำดับ เนื่องจากมีการเติมกรดลีวูลินิก และลดลงจนมีค่าประมาณ 5 หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง

ผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อการเพิ่มการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อโดยที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ เชื้อมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เท่ากับ 615 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 10.25 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง (รูปที่ 18) ส่วนชุดควบคุมผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เท่ากับ 514 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 7.14 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากแมกนีเซียมคลอไรด์มีหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ ALA synthetase เพื่อเร่งปฏิกริยาในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก หน้าที่ของโคแฟคเตอร์จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งประเภทกรดเลวิส (Lewis acid catalyst) คือเป็นตัวที่สามารถรับอิเล็กตรอนคู่จากโมเลกุลอื่นมาแล้ว ทำให้มีจำนวนอิเล็กตรอนภายใน shell ครบ ทำให้มีความเสถียร นอกจากนี้อาจจะทำให้เกิดโครงรูปหรือโครงสร้างที่เหมาะสมที่จะเกิดปฏิกิริยาได้โดยโลหะจะไปจับกับเอนไซม์และสับสเตรต เช่นในกรณีของเอนไซม์ครีเอทีนไคเนส



รูปที่ 18 ผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อการเจริญ, พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหาร กลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37°ซ

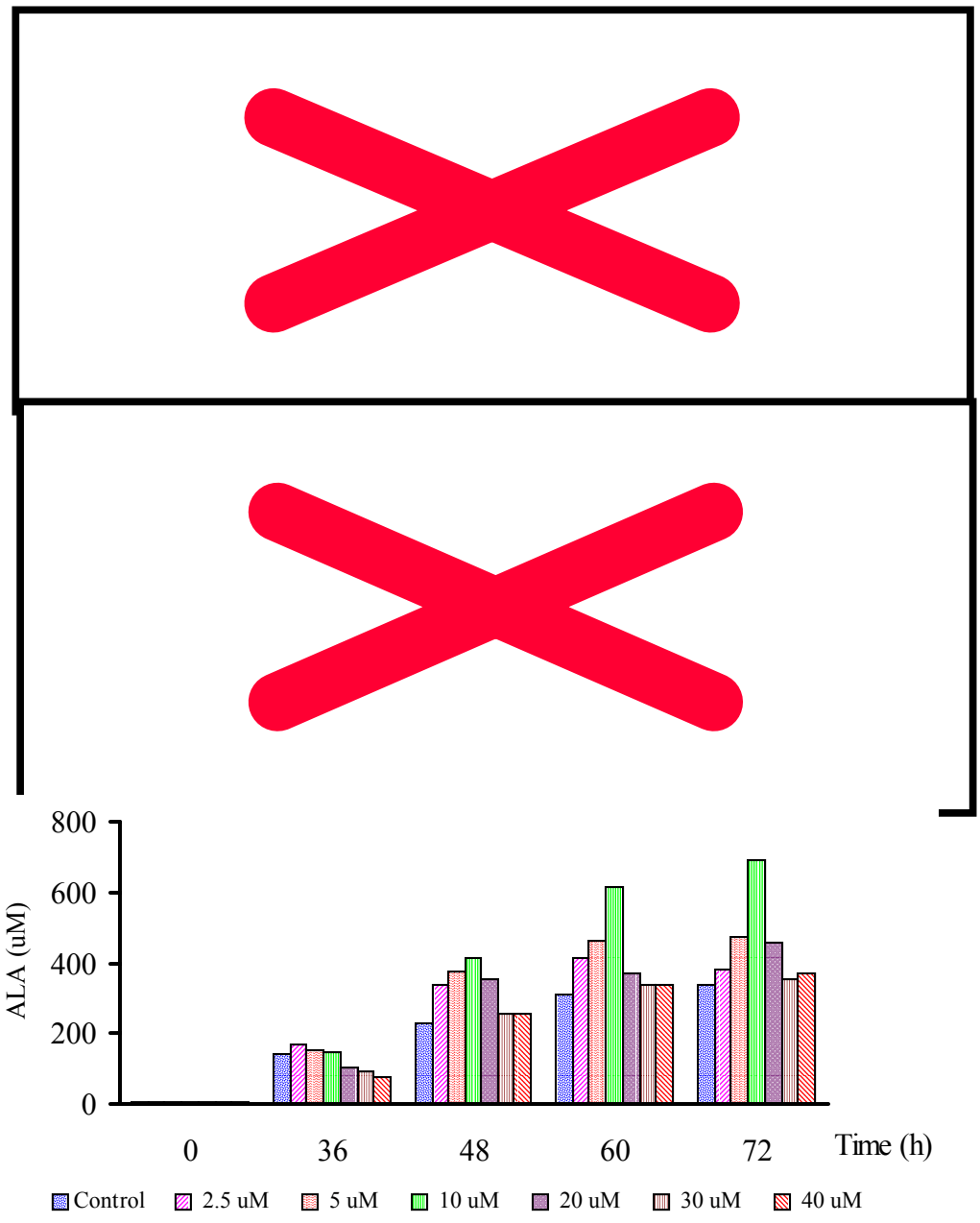
Fig. 18 Effect of $MgCl_2$ on growth, pH and ALA production from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

(creatine kinase) สับสเตรตของเอนไซม์จะไม่ใช่ ATP แต่เป็น Mg^{2+}-ATP ในกรณีนี้ Mg^{2+} ไม่ได้ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเอนไซม์ครีเอทีนไคเนส แต่ทำให้ประจุลบบน ATP เป็นกลางทำให้ ATP นั้นสามารถจับกับเอนไซม์ได้ง่ายเกิดเป็น ternary complex ซึ่งเรียกว่า substrate bridge complex โดย Mg^{2+} จะ coordinate กับ ATP เกิดเป็นสับสเตรตที่แท้จริง คือ Mg^{2+}-ATP และการจับของ Mg^{2+} กับ ATP นี้อาจทำให้พันธะ P-O ส่วนปลาย (terminal P-O bond) ของ ATP แตกออกได้ง่าย ทำให้การส่งหมู่ฟอสเฟตนี้ไปให้สับสเตรตอีกตัวของเอนไซม์เกิดได้ง่ายขึ้น (พัชรา วีระกะลัส, 2541)

1.0 ผลของไพริดอกซัลฟอสเฟต

ผลของการเติมไพริดอกซัลฟอสเฟตต่อการเจริญของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ในอาหาร กลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% และเติมไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์ ซัคซิเนต 40 มิลลิโมลาร์ กรดโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ 15 มิลลิโมลาร์ กรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) (รูปที่ 19) พบว่าเมื่อเติมไพริดอกซัลฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 30 และ 40 ไมโครโมลาร์ พบว่าเชื้อมีการเจริญได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยให้มวลชีวภาพเท่ากับ 1.24, 1.29, 1.31, 1.36, 1.43 และ 1.52 กรัมต่อลิตร สำหรับในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมไพริดอกซัลฟอสเฟตให้มวลชีวภาพเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของไพริดอกซัลฟอสเฟตมีผลต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 โดยที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 692 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 9.61 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเท่ากับ 556 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 7.72 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกมีปริมาณลดลงเมื่อความเข้มข้นของไพริดอกซัลฟอสเฟตเพิ่มขึ้นเพิ่มขึ้นทั้งนี้เนื่องจากไพริดอกซัลฟอสเฟตมีหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ ALA synthetase ซึ่งเอนไซม์อาจจะต้องการโคเอนไซม์เพียงเล็กน้อย และหากมีปริมาณมากเกินความต้องการอาจมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่งผลให้การ



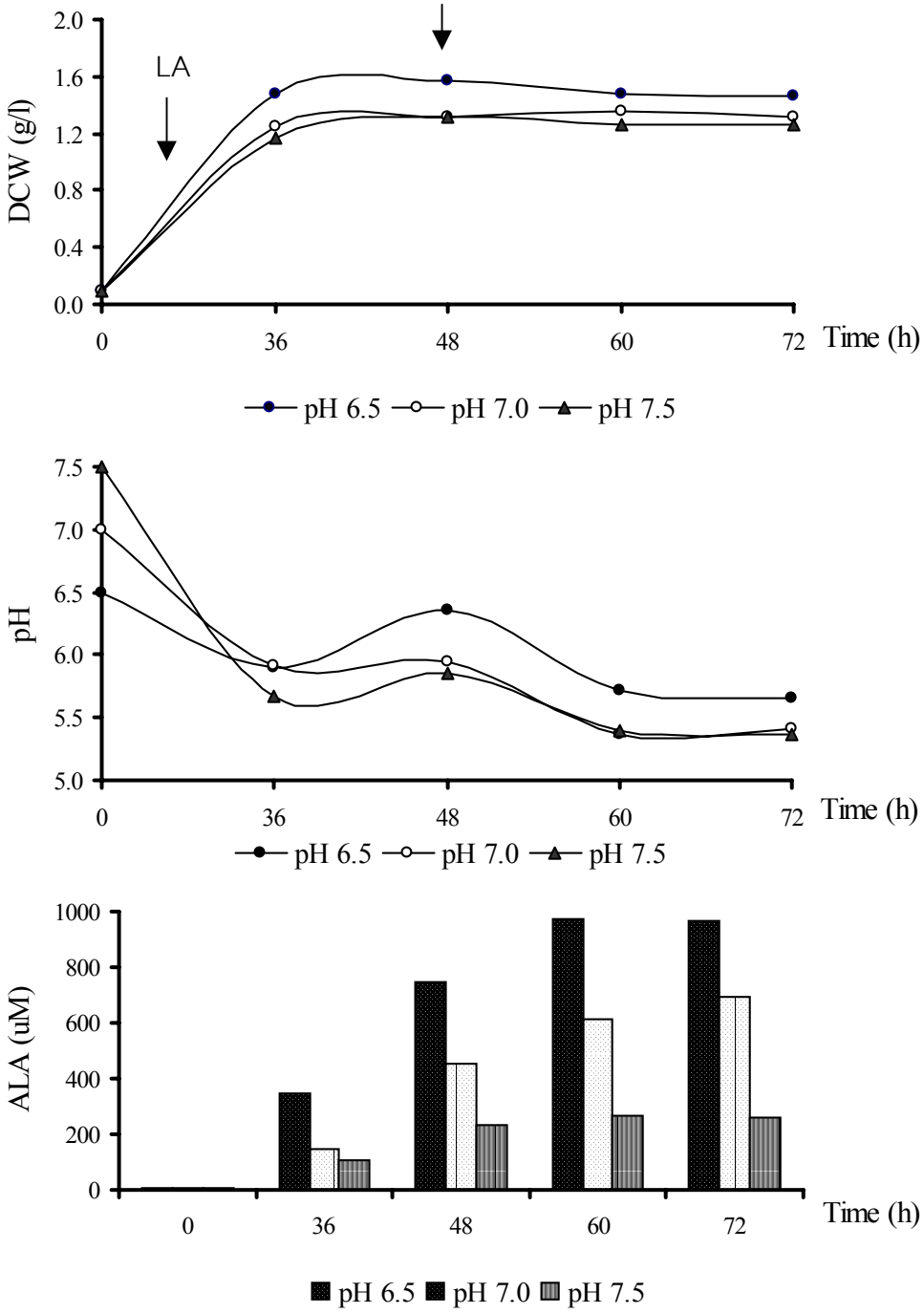
รูปที่ 19 ผลของไพริดอกซัลฟอสเฟตต่อการเจริญ, พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Fig. 19 Effect of pyridoxal phosphate (PLP) on growth, pH and ALA production from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

ผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกลดลง สำหรับหน้าที่ของไพริดอกซัลฟอสเฟตจะไปกระตุ้นไกลซีนแล้วทำให้เกิด Schiff-base ที่ทำให้ α-carbon ของไกลซีนไปรวมกับ carbonyl carbonของซัคซิเนตได้ภายหลังการรวมกันของไกลซีนและซัคซิเนตแล้วจะได้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ซึ่งจะนำไปสังเคราะห์เป็นสารเตตราไพโรลต่อไป นอกจากนี้ ไพริดอกซัลฟอสเฟตอาจมีการแตกสลายของโมเลกุลหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารใหม่ขึ้น เช่น pyridoxal และ pyridoxamine โดยจะไปรวมกับหมู่ $-NH_2$ หรือ –SH ที่อยู่ในโปรตีนทำให้เกิดสารพวก aldimine หรือ ketomine เช่น pyridoxyl-ε-aminolysine และ cysteine-bound pyridoxal ซึ่งสามารถไปจับกับโลหะบางชนิดที่มีอยู่ ทำให้เสียคุณสมบัติของการเป็นวิตามินไป (สมทรง เลขะกุล, 2543) ซึ่งจากการทดลองพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมโลหะอิออน เช่น แมกนีเซียม แมงกานีส เป็นต้น ดังนั้นอาจเป็นไปได้ที่ไพริดอกซัลฟอสเฟตที่มีการเปลี่ยนรูปจะไปจับกับโลหะเหล่านี้ทำให้ไพริดอกซัลฟอสเฟตไม่สามารถทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ ALA synthetase ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงและมีผลต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกลดลงเช่นกัน

3.8 ผลของพีเอชเริ่มต้น

ผลของพีเอชเริ่มต้น 4.5-8.0 ต่อการเจริญและการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลต ที่มีเกลือ 3% และมีการเติมไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์, ซัคซิเนต 40 มิลลิโมลาร์, กรดโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมคลอไรด์ 15 มิลลิโมลาร์, ไพริดอกซัลฟอสเฟต 10 ไมโครโมลาร์ และเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) (รูปที่ 20) พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในพีเอชเริ่มต้น 6.5, 7.0 และ 7.5 โดยเชื้อให้ปริมาณมวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 1.66, 1.32 และ 1.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 8.0 เนื่องจากพีเอชที่สูงหรือต่ำไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยมีรายงานของ Pfennig (1967) ว่าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชของอาหารเริ่มต้น 7.0-7.5 ส่วน Sasaki และ Nagai (1979) รายงานว่าเชื้อ *Rhodopseudomonas*



รูปที่ 20 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ, พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37°ซ

Fig. 20 Effect of initial pH on growth, pH and ALA production from *Rhodobacter capsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

gelatinosa เจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 และสามารถเจริญได้ดีที่ พีเอชเริ่มต้นในช่วง 6.5-7.5 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็นด่าง (พีเอช 8.0) จะมีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นจำนวนมากทั้งนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมสารต่างๆ ที่มีความเป็นกรดหลายชนิดทำให้พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีความเป็นกรดสูง (พีเอชประมาณ 4) และมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 3% ดังนั้นในอาหารจึงมีความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูงทำให้เกิดการตกตะกอนซึ่งสังเกตได้จากการทดลอง ดังนั้นเกลือที่เกิดขึ้นบางส่วนอาจรวมตัวกับสารอาหาร และตกตะกอนอยู่ที่ก้นขวดทดลองที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเชื้อจึงนำสารอาหารไปใช้ไม่ได้ ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้

นอกจากนี้มีรายงานว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการแตกตัวของสารประกอบที่เป็นกรดหรือด่าง และอาจมีผลยับยั้งหรือเป็นพิษต่อเชื้อ เช่น กรดอะซิติกซึ่งเป็นกรดอ่อน เมื่อแตกตัว พบว่าส่วนที่เป็นกรดอิสระสามารถละลายไขมันมากกว่าส่วนที่อยู่ในรูปอิออน ดังนั้นพีเอชที่มีความเป็นกรดจะทำให้กรดอะซิติกสามารถซึมเข้าไปในเซลล์ได้ดีส่งผลให้เชื้อมีการเจริญลดลง ซึ่งจากการทดลองได้มีการเติมกรดหลายชนิด เช่น โพรพิโอนิก และกรดลีวูลินิก ดังนั้นพีเอชจึงมีผลต่อการแตกตัวของกรดเหล่านี้ซึ่งกรดที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวสามารถซึมเข้าไปในเซลล์ทำให้ภายในเซลล์เป็นกรด ซึ่งอาจจะไปยับยั้งการเมตาบอลิซึมต่างๆ ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญลดลง และพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีผลต่อองค์ประกอบของอาหารเนื่องจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งโปรตีน วิตามิน แร่ธาตุ ซึ่งหากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดหรือด่างสูงจะทำให้สารอาหารต่างๆ เสียสภาพได้เช่นกัน ดังนั้นเชื้อจึงไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้และยังมีรายงานว่าพีเอชมีผลต่อคุณสมบัติการยึดเกาะของเชื้อ เช่น การยึดเกาะที่ผิวแก้วหรือโลหะ และการรวมตัว (flucculation) ของเชื้อ นอกจากนี้พีเอชยังมีผลต่อระดับการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะอิออน

สำหรับผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก พบว่าเชื้อมีการผลิตได้เท่ากับ 976.5, 692 และ 267.3 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 16.27, 13.36 และ 6.12 ไมโครโมลาร์ต่อลิตร ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5, 7.0 และ 7.5 ตามลำดับ มีรายงานของ Sasaki และคณะ (1997) พบว่าความเข้มข้นของกรดลีวูลิกที่เติมไปเพื่อยับยั้ง

เอนไซม์ ALA dehydratase (ALAD) ขึ้นอยู่กับพีเอชของอาหารด้วยโดยที่พีเอช 7.5 การทำงานของเอนไซม์ ALAD ลดลง ร้อยละ 20 เมื่อเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดลีวูลินิกเป็น 100 มิลลิโมลาร์ การทำงานของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 45 ส่วนที่พีเอช 6.5 การทำงานของเอนไซม์ ALAD จะลดลงร้อยละ 60 เมื่อเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ และที่พีเอช 5.5 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึงร้อยละ 85 เมื่อเติมกรดลีวูลินิกที่ 5 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้อาหารที่เป็นด่างจะมีผลต่อการสลายตัวของกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้น ปราณี อ่านเปรื่อง (2543) รายงานว่าผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์โดยส่วนใหญ่ พบว่ามีผลต่อการแตกอิออน (ionization) ของ prototrophic group ที่อยู่ในบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติซึ่งจะมีผลไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับกับสับสเตรต หรือการเร่งปฏิกริยา นอกจากนี้พีเอชยังไปมีผลต่อการเกิด ES (Enzyme-Substrate) การแตกตัวของอิออนของสับสเตรต โคแฟคเตอร์ ซึ่งจะนำไปสู่การจับกับเอนไซม์ที่เปลี่ยนไปด้วย

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์พบว่าเชื้อมีการสะสมเท่ากับ 285.47 ไมโครโมลาร์ และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในและภายนอกเซลล์ (976.5 ไมโครโมลาร์) พบว่าปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์น้อยกว่าภายนอกเซลล์ 3.4 เท่า การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเพิ่มขึ้นหรือลดลงมีผลมาจากพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเกี่ยวข้องกับกรดลีวูลินิกที่มีการเติมในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้กรดลีวูลินิกที่เติมจะอยู่ในรูปที่แตกตัวและไม่แตกตัว ซึ่งกรดลีวูลินิกที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase จะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวและจะพบมากในอาหารที่พีเอชต่ำแต่อาหารที่มีพีเอชต่ำมีผลต่อการเจริญของเชื้อ เพราะฉะนั้นในการเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชให้เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก คือ เอนไซม์ ALA synthetase และเอนไซม์ ALA dehydratase

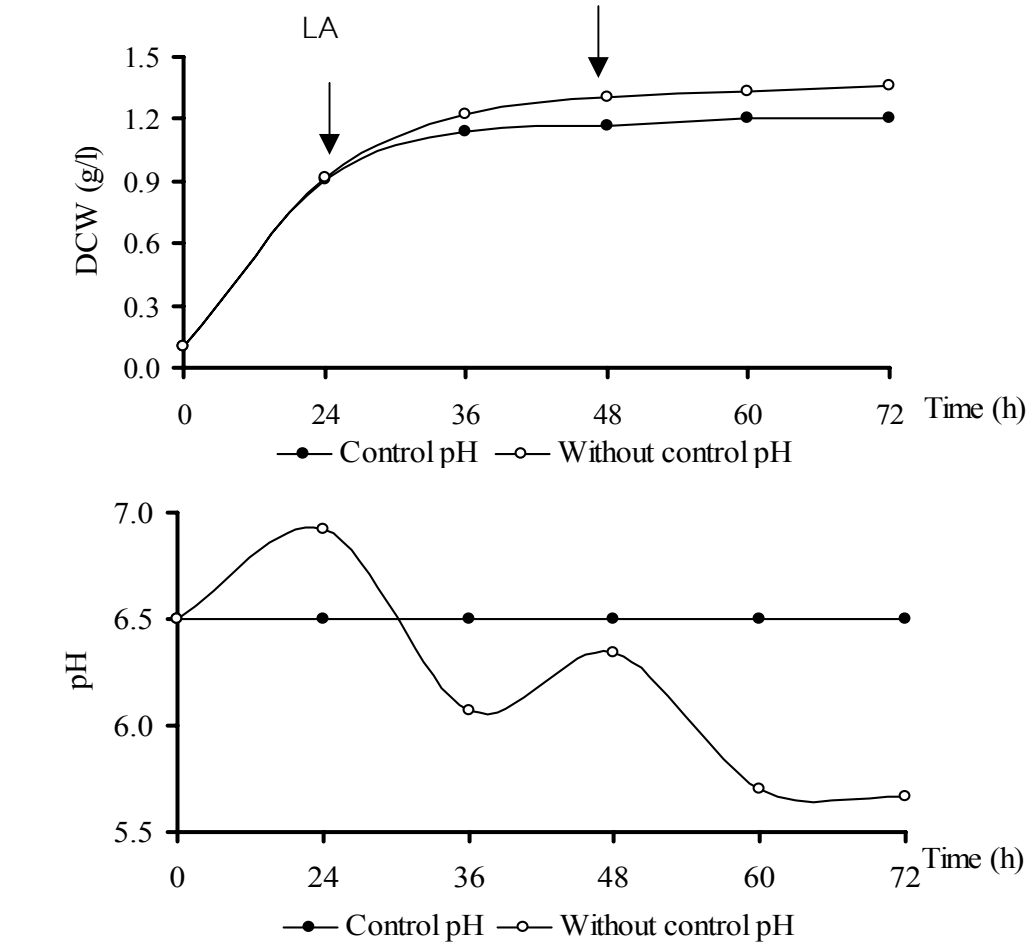
3.9 ผลของการควบคุมพีเอช

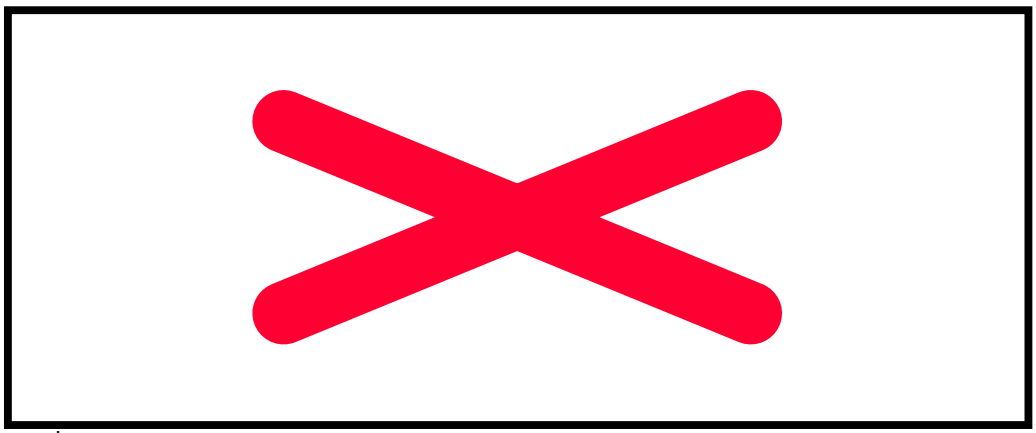
จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ในถังหมักที่มีการเติมไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์ ซัคซินิค 40 มิลลิโมลาร์ โพรพิโอนิก 0.5

กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ 15 มิลลิโมลาร์ ไพริดอกซัลฟอสเฟต 10 ไมโครโมลาร์ และเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้งที่ 24 และ 48 ชั่วโมงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ โดยมีการควบคุมพีเอชเป็น 6.5 ซึ่งเป็นพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ในขวดทดลองเปรียบเทียบกับไม่ควบคุมพีเอช (รูปที่ 21) พบว่าการเลี้ยงแบบควบคุมพีเอช และการเลี้ยงแบบไม่ควบคุมพีเอชให้มวลชีวภาพเท่ากับ 1.20 กรัมต่อลิตร และ 1.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบไม่ควบคุมพีเอชให้มวลชีวภาพ (1.36 กรัมต่อลิตร) น้อยกว่าในการเลี้ยงในขวดทดลอง (1.66 กรัมต่อลิตร) และเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบควบคุมพีเอชพบว่าเชื้อให้มวลชีวภาพลดลง (1.20 กรัมต่อลิตร) ทั้งนี้เนื่องจากการเติมกรดลีวูลินิกในระหว่างการเลี้ยงเชื้อทำให้พีเอชมีค่าลดลงมาก (พีเอช 5.7) ดังนั้นในการควบคุมพีเอชต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับพีเอช มีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อมีการเจริญลดลง

นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอช สีของเชื้อเป็นสีแดงซึ่งต่างจากการเลี้ยงในขวดทดลองซึ่งเชื้อมีสีน้ำตาลส้มและมีการจับตัวเป็นก้อน ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงในถังหมักมีการกวนเล็กน้อย (100 รอบต่อนาที) ทำให้เชื้อไม่จับตัวเป็นก้อน ไม่มีการให้อากาศ และมีการให้แสง 3,000 ลักซ์ แต่เชื้อที่เจริญในถังหมักอาจจะได้รับแสงไม่เท่ากัน เชื้อบางส่วนที่ได้รับแสงน้อยจำเป็นต้องสร้างรงควัตถุมากขึ้นเพื่อกักเก็บแสง และอาจจะมีการผลิตเอนไซม์ ALA synthetase และเอนไซม์ ALA dehydratase เพิ่มขึ้นเพื่อเร่งการผลิตรงควัตถุทำให้การเติมกรดลีวูลินิกมีผลในการยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase ลดลง ดังนั้นกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจึงน้อยกว่าการเลี้ยงในขวดทดลองซึ่งได้รับแสงสม่ำเสมอ ส่วนเชื้อที่ได้รับแสงมากการสร้างรงควัตถุจึงลดน้อยลงดังนั้นการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจึงลดลงด้วย

สำหรับการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในถังหมักที่มีการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอช พบว่าก่อนการเติมกรดลีวูลินิกเชื้อมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเพียงเล็กน้อยเท่ากับ 25 ไมโครโมลาร์ หลังจากการเติมกรดลีวูลินิก 12 ชั่วโมง (36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ) เชื้อสามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้เพิ่มขึ้นทั้งในชุดควบคุมและไม่ควบคุมพีเอช โดยผลิตได้เท่ากับ 185.8 และ 287.6 ไมโคร





รูปที่ 21 ผลของการควบคุมพีเอชและไม่ควบคุมพีเอชต่อการเจริญ, พีเอช และการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ในถังหมักขนาด 2 ลิตรภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) อุณหภูมิ 37 °ซ

Fig. 21 Effect of control pH and uncontrol pH on growth, pH and ALA production from *Rhodobactercapsulatus* SS3 cultivated in GM medium containing 3% NaCl of a 2 L fermentor under microaerobic-light (3,000 lux) condition at 37°C

โมลาร์ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้น 7.4 และ 11.5 เท่าตามลำดับ นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอช เชื้อมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้ 608.31 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 8.45 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง ส่วนการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าเชื้อมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเท่ากับ 632.25 ไมโครโมลาร์ และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 8.78 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกและอัตราการผลิตของเชื้อที่เลี้ยงในถังหมักที่ไม่มีการควบคุมพีเอชกับในขวดทดลอง พบว่าการเลี้ยงในถังหมักเชื้อผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (608.31 ไมโครโมลาร์) และมีอัตราการผลิต เท่ากับ 8.45 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง โดยมีการผลิตน้อยกว่าในขวดทดลอง (976.48 ไมโครโมลาร์) และมีอัตราการผลิต เท่ากับ 16.27 ไมโครโมลาร์ต่อชั่วโมง ซึ่งในการเลี้ยงในถังหมักเชื้อมีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกลดลง 0.62 เท่าและมีอัตราการผลิตลดลง 1.9 เท่า เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในขวดทดลอง

ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การได้รับแสง โดยจะมีผลต่อการสร้างรงควัตถุหากเชื้อได้รับแสงมาก การผลิตรงควัตถุจะลดลง และหากได้รับแสงน้อย การผลิตรงควัตถุจะเพิ่มขึ้นซึ่งจะมีแนวโน้มในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตรงควัตถุเพื่อการสังเคราะห์แสง

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกที่ได้จากเชื้อที่เลี้ยงในถังหมักที่มีการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชมีการผลิตใกล้เคียงกับปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกที่ได้จากรายงานของ Naparatnaraporn และคณะ (2000) โดยเชื้อ *Rhodovulum* sp. PS88 (700 ไมโครโมลาร์) ที่เลี้ยงในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง (5,000 ลักซ์) อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที มีการควบคุมพีเอชที่ 6.5 เติมสารตั้งต้นไกลซีน 30 มิลลิโมลาร์และซัคซิเนต 30 มิลลิโมลาร์ และกรดลีวูลินิก 3 ครั้ง ครั้งละ 15 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกที่ได้จากการทดลองนี้มีปริมาณสูงกว่าถึง 2.7 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (260 ไมโครโมลาร์) จากเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* เมื่อมีการเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ และให้แสง 3,000 ลักซ์ แต่เมื่อมีการเติมสารตั้งต้นไกลซีน 30 มิลลิโมลต่อลิตรและซัคซิเนต 30 มิลลิโมลต่อลิตร เชื้อ *R. sphaeroides* สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงถึง 2 มิลลิ

โมลต่อลิตร (Sasaki *et al*.,1987) ซึ่งในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกที่ได้ในปริมาณแตกต่างกันนี้อาจเป็นผลมาจากสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง และสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง

และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกที่อยู่ภายในเซลล์ของเชื้อ *Rhodobacter capsulatus* SS3 พบว่าได้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์เท่ากับ 19.20 ไมโครโมลาร์ และกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายนอกเซลล์ 630 ไมโครโมลาร์ โดยกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกที่อยู่ภายนอกเซลล์มีค่ามากกว่ากรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์ ประมาณ 32.81 เท่า แสดงว่าเชื้อไม่ต้องการสะสมกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในเซลล์ในปริมาณสูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกมีความเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งอาจเป็นผลจากความเป็นกรด เชื้อจึงมีการหลั่งออกนอกเซลล์เพื่อให้เซลล์ไม่ได้รับความเสียหาย