บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมาตั้งแต่สมัยอดีตกาล ซึ่งประชากรมากกว่าร้อยละ 70 ประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก เพื่อเลี้ยงคนส่วนใหญ่ของประเทศ รวมทั้งส่งเป็นสินค้าออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศด้วย การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรโดยทั่วไปเกษตรกรจะใช้ปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืชเพื่อเพิ่มผลผลิต ในขณะเดียวกันพันธุ์พืชที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูงส่วนใหญ่จะต้องใช้ปุ๋ยในอัตราสูงและใช้สารกำจัดศัตรูพืชเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามการใช้สารกำจัดศัตรูพืชบ่อยครั้งในพื้นที่กว้างและขาดความรู้ความเข้าใจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อต่อสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ ปัญหาพิษตกค้างในอาหาร ปัญหาพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม และปัญหาการเกิดพิษภัยต่อผู้ใช้ การวิจัยเพื่อลดปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้หลายแนวทาง เช่น การใช้สารทางชีวภาพซึ่งสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (5-Aminolevulinic acid หรือ ALA) เป็นสารกำจัดวัชพืชและสารกำจัดแมลงทางชีวภาพที่ไม่ทำลายพืชปลูกทางเกษตร ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการเจริญของพืชบางชนิด เช่น มันฝรั่ง ข้าวบาร์เลย์ และผักขม เป็นต้น (Tanaka *et al*., 1994) และเป็นสารที่มีแนวโน้มในการใช้ทางการแพทย์และเภสัชกรรม (Ano *et al*., 1999) ALA เป็นสารที่สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด *เช่น Pseudomonas riboflawin, Clostridium thermoaceticum, Methanogenacian berkeri* รวมทั้งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยเฉพาะสายพันธุ์ *Rhodobacter sphaeroides* ซึ่งผลิต ALA ได้ในปริมาณสูง (Sasaki *et al*., 1987) งานวิจัยนี้มุ่งจะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิต ALA จากแบคทีเรียสังเคราห์แสงที่แยกได้ซึ่งมีคุณสมบัติทนเค็มเพื่อเป็นข้อมูลในการขยายผลสู่การผลิตปริมาณมากต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. **แบคทีเรียสังเคราะห์แสง** (Photosynthetic Bacteria)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน เป็นพวกแอนแอโรบ และไม่ให้ก๊าซออกซิเจนในกระบวนการสังเคราะห์แสง จัดอยู่ในอันดับ โรโดสไปริลลาเลส (Rhodospirillales) มีลักษณะดังนี้คือ ดำรงชีวิตแบบโฟโตลิโธโทรฟ (photolithotroph) และ/หรือโฟโตออร์แกโนโทรฟ (photoorganotroph) มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ซึ่งแตกต่างจากของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่าย มีรงควัตถุคาโรทีนอยด์ (carotenoid) ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งช่วยจับพลังงานแสงและส่งให้แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เจริญในที่ไม่มีก๊าซออกซิเจน และไม่สร้างก๊าซออกซิเจน (anoxygenic) เพราะมีแต่ระบบโฟโตซิสเต็ม I (photosystem I) พบในน้ำจืดน้ำเค็ม ที่ไม่มีก๊าซออกซิเจนอยู่ใต้แหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์มาก เช่น บ่อน้ำนิ่ง บึง หนอง หรือก้นทะเลสาบ แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ดูดแสงได้ดีที่สุดเมื่อช่วงความยาวคลื่นประมาณ 725-745 นาโนเมตร (ช่วงยาวสุดของสเปคตรัมที่ตามองเห็น) ถึงช่วงคลื่น 1035 นาโนเมตร (อินฟราเรด) ซึ่งแสงนี้มีความยาวคลื่นยาวกว่าที่แบคทีเรียหรือสาหร่ายที่สังเคราะห์ให้ก๊าซออกซิเจนจะเจริญที่ผิวบนๆ ของแหล่งน้ำไม่ดูดแสงนี้ จึงทำให้แสงนั้นผ่านลงไปถึงพวกแอนออกซิเจนิก (anoxygenic) ได้ สีของแอนออกซิเจนิกแบคทีเรีย เกิดจากคาโรทีนอยด์มากกว่าเกิดจากแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ จึงแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามสีรงควัตถุ คือ แบคทีเรียสีม่วง (purple bacteria) และแบคทีเรียสีเขียว (green bacteria) ถ้าเคลื่อนที่ได้จะใช้แฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ ยกเว้นตระกูลคลอโรเฟลกซาซี (Chloroflexaceae) มีการเคลื่อนที่แบบคืบคลาน แบคทีเรียสีม่วงและแบคทีเรียสีเขียวอาจตรึงไนโตรเจนได้ ถ้าสภาพเป็นแอนแอโรบและมีแสงส่อง (Staley *et al*., 1989)

1.1 **แบคทีเรียสีม่วง** (Purple Phototrohic bacteria)

มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอ หรือ บี และคาโรทีนอยด์ช่วยดูดพลังงานแสงด้วย รงควัตถุเหล่านี้จะอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งอาจรวมกันเป็นเวซิเคิล (vesicle) ลาเมลลา (lemella) หรือ ทิวบูล (tubule) มี 2 ตระกูลคือ

1.0.0 **ตระกูลโรโดสไปริลลาซี** (*Rhodospirillaceae*)

ได้แก่ เพอเพิลแบคทีเรียที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ (purple non-sulfur bacteria) เซลล์รูปกลมท่อน เกลียว เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งแยกตัวแบบทวิภาค หรือการแตกหน่อเคลื่อนที่ได้ โดยทั่วไปเป็นพวกต้องการออกซิเจนเล็กน้อย เป็นพวกโฟโตออร์แกนโนโทรฟ คือ ใช้สารอินทรีย์เป็นทั้งแหล่งคาร์บอน และตัวให้อิเล็กตรอนในการรีดิวซ์คาร์บอนไดออกไซด์ บางชนิดอาจเติบโตได้ในสภาพออโตโทรฟ โดยใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ไม่มีพวกใดที่สามารถใช้ธาตุซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน การสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดขึ้นในสภาพมีแสงและไม่มีออกซิเจน บางชนิดสามารถเติบโตได้ในสภาพมีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อยโดยการหายใจโดยใช้สารประกอบอินทรีย์ ในสภาพมีออกซิเจนโคโลนีมีสีส้ม-น้ำตาล ถึงม่วง-แดง ในสภาพไม่มีออกซิเจนบางพวกมีสีเหมือนสภาพมีออกซิเจน แต่บางพวกมีสีเขียว-เหลือง ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น

Rhodospirillum รูปร่างเกลียว เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งแยกตัวแบบทวิภาค เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้ว ติดสีแกรมลบ ประกอบด้วย แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ สารสีทั้งสองอยู่ที่เมมเบรน ไม่มีแก๊สแวคิวโอล สังเคราะห์แสงในสภาพไม่มีออกซิเจนและมีแสง ส่วนใหญ่สามารถเติบโตในสภาพมีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อยโดยการออกซิไดซ์สารอินทรีย์

Rhodopseudomonas รูปร่างเป็นท่อน ไข่ หรือกลม เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งแยกตัวแบบทวิภาค หรือการแตกหน่อไม่มีโพรสธีกา (prosthecae) เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้ว ติดสีแกรมลบประกอบด้วยแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอหรือบี และแคโรทีนอยด์ ไม่มีแก๊สแวคิวโอล สังเคราะห์ด้วยแสงในสภาพไม่มีออกซิเจน บางชนิดสามารถเติบโตในสภาพมีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อยโดยการออกซิไดซ์

Rhodomicrobium เซลล์รูปไข่ เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อโดยแตกจากปลายของโพรสธีกา เมื่อเซลล์ลูกโตเต็มที่จะหลุดออกไปเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลารอบตัว แกรมลบประกอบด้วยแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ และคาโรทีนอยด์ สังเคราะห์แสงในสภาพไม่มีออกซิเจน ส่วนใหญ่เติบโตได้ในที่มืดในสภาพมีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อยโดยการออกซิไดซ์

Rhodobacter รูปร่างเป็นท่อน ไข่ ขนาด 0.5-1.2 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาหรือเคลื่อนที่ไม่ได้ เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งแยกตัวแบบทวิภาค บางครั้งมีการผลิตแคปซูลหรือเมือก ติดสีแกรมลบ ประกอบด้วย แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ สารสีทั้งสองอยู่ที่เมมเบรน เจริญได้ดีในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Staley *et al*., 1989)

1.0.0 **ตระกูลโครมาติอาซี** (*Chromatiaceae*)

ได้แก่ เพอเพิลซัลเฟอร์แบคทีเรีย (purple sulfer bacteria) มีลักษณะดังนี้มีรูปร่างแตกต่างกัน ตั้งแต่รูปไข่จนถึงรูปท่อน เช่น *Chromatium* รูปทรงกลม เช่น *Thiocystis* หรือบิดเป็นเกลียว เช่น *Thiospirillum* พวกทรงกลมอาจเรียงกันสองเซลล์เป็นดิโพรค็อกไค เช่น *Lamprocystis* หรือแปดเซลล์เรียงเป็นรูปลูกบาศก์ เช่น *Thiosarcina* หรือเป็นแผ่นแบนๆ เช่น *Thiopedia* บางชนิดมีแก๊สแวคิวโอล มีรงควัตถุสีเขียวเทา มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ คาโรทีนอยด์ สีเหลือง แดง รงควัตถุให้สีที่ผสมกันแล้วเป็นสีม่วง จนถึงน้ำตาลหรือแดง เป็นพวกแอนแอโรบ หรือไมโครแอโรฟิลิก ต้องการแสงในการสังเคราะห์แสง (photolithotroph) ใช้สารประกอบซัลเฟอร์ในสภาพ รีดิวซ์ (reduced S compound) โดยเฉพาะก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือธาตุซัลเฟอร์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (ไฮโดรเจน) เพื่อตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และได้ซัลเฟอร์เก็บสะสมไว้ภายในเซลล์หรือภายนอกเซลล์ บางชนิดใช้สารอินทรีย์ เช่น กรดไขมัน แทนที่ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นตัวให้ไฮโดรเจน (photoorganotroph) พบในธรรมชาติที่มีก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

1.2 **แบคทีเรียสีเขียว** (Green phototrophc bacteria)

มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ซี หรือ แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ดี แต่มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอ น้อย รงควัตถุที่ใช้สังเคราะห์แสงอยู่ที่เวซิเคิลที่มีเยื่อหุ้มภายในเซลล์ บางชนิดอาจเกาะติดที่เยื่อหุ้มเซลล์ มี 2 ตระกูล คือ

1.2.1 **ตระกูลคลอโรบิอาซี** (Chlorobiaceae)

ได้แก่ กรีนซัลเฟอร์แบคทีเรีย (green sulfer bacteria) โฟโตลิโธโทรฟ สามารถออกซิไดซ์สารประกอบอนินทรีย์ซัลเฟอร์ในสภาพรีดิวซ์ เช่น ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ได้เม็ดซัลเฟอร์สะสมไว้นอกเซลล์ เป็นแอนแอโรบ ไม่สามารถเจริญในที่มืด แม้สภาพแวดล้อมเป็น

ไมโครแอโรฟิลิก เซลล์เป็นรูปไข่ รูปถั่ว รูปท่อน เช่น *Chlorobium* ส่วน *Prosthecochloris* เซลล์เป็นรูปดาว เนื่องจากสร้างโพรสธีกา

1.2.2 ตระกูลคลอโรเฟลกซาซี (Chloroflexaceae)

ได้แก่ กรีนนันซัลเฟอร์แบคทีเรีย (green non-sulfur bacteria) มีลักษณะดังนี้ที่สำคัญ คือ *Chloroflexus* เป็นพวกชอบอุณหภูมิสูง (52-60) พบในน้ำพุร้อน เป็นแผ่นสีเขียวหรือส้ม เซลล์เป็นเส้นสายหรือไตรโคม เคลื่อนที่แบบคืบคลาน เป็นโฟโตออร์แกโนโทรฟเป็นส่วนใหญ่เหมือนเพอเพิลนันซัลเฟอร์แบคทีเรีย แต่ก็สามารถเจริญแบบโฟโตลิโธโทรฟ โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ ในที่มืดเจริญแบบเคโมเฮเทอโรโทรฟใช้ออกซิเจนได้ (Staley *et al*., 1989)

2. การจำแนกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

การเทียบเคียงแบคทีเรียที่แยกได้มักดำเนินการตามวิธีการที่ระบุอยู่ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Staley *et al*., 1989) ดังนี้

1.0 การจำแนกระดับวงศ์ (Family)

การแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียเพอเพิลซัลเฟอร์ (purple sulfur bacteria) และเพอเพิลที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ (purple non-sulfur) สามารถทำได้โดยพิจารณาลักษณะและสมบัติต่างๆ ของแบคทีเรียดังนี้

1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ได้แก่ การศึกษารูปร่างของเซลล์ การย้อมติดสีแกรม ขนาดความกว้าง (เส้นผ่าศูนย์กลาง) ความยาว ตำแหน่งแฟลกเจลลา โครงสร้างของเมมเบรนภายในเซลล์ การแบ่งเซลล์ การผลิตหรือไม่ผลิตเมือกรอบแคปซูล (slime capsules) เม็ดซัลเฟอร์ แก๊สแวคคิวโอล และองค์ประกอบรงควัตถุ วัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงกว้างของเซลล์ในของเหลว (cell suspension) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยวิธี scanning นำมาเทียบค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุชนิดต่างๆ เพื่อทราบชนิดของรงควัตถุ (Pfennig and Truper, 1989)

1) สมบัติทางสรีรวิทยา (physiology) โดยการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน การเจริญในสภาพไร้แสงทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน การทนซัลไฟด์ และไธโอ

ซัลเฟต ในระดับความเข้มข้นที่กำหนด การเจริญในอาหารที่มีองค์ประกอบของซัลไฟด์ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไธโอซัลเฟต และไบคาร์บอเนต ซึ่งจะมีเฉพาะพวก purple sulfur bacteria และ green sulfur bacteria เท่านั้นที่เจริญได้ในอาหารเหล่านี้ หากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่นำมาทดสอบไม่เจริญในอาหารดังกล่าว แต่เจริญได้ในอาหารที่มีสารประกอบอินทรีย์ จะจัดเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มเพอเพิลที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ เนื่องจากซัลไฟด์เป็นตัวยับยั้งการเจริญของ เพอเพิลที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ (ยกเว้นเพอเพิลที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ชนิด *Rhodopseudomonas sulfidophila* เท่านั้นที่เจริญได้) (Drew and Imhoff, 1991) นอกจากนี้ยังพิจารณาจากการผลิตออกซิเจนออกมาและอื่นๆ (Pfennig and Truper, 1974)

1.0 การจำแนกระดับสกุลและชนิด

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มเพอเพิลที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ (Purple non-sulfur bacteria) จัดอยู่ในวงศ์ Rhodospirillaceae จัดจำแนกแบคทีเรียวงศ์นี้ออกเป็น 6 สกุล (Pfennig and Truper, 1974) คือ

1. เซลล์มีรูปร่างเป็นเกลียว ความกว้าง 0.7-1.5 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้ว (polar flagella) เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งตัว จัดอยู่ในสกุล *Rhodospirillum*
1. เซลล์รูปร่างเรียว ความกว้าง 0.5-1.2 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้ว เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งตัว เจริญได้ดีที่พีเอชเป็นกรด จัดอยู่ในสกุล *Rhodopila*
1. เซลล์รูปร่างเรียว รูปไข่ หรือรูปท่อน ความกว้าง 0.6-5.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้หรือไม่ได้ เพิ่มจำนวนโดยการแบ่งตัวเรียงกันเป็นสาย สามารถเจริญได้ดีในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสง จัดอยู่ในสกุล *Rhodobacter*
1. เซลล์รูปไข่ถึงรูปท่อน ความกว้าง 0.6-2.5 ไมโครเมตร ความยาว 0.6-5.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้หรือไม่ได้ เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ จัดอยู่ในสกุล*Rhodopseudomonas*
1. เซลล์รูปไข่ ความกว้าง 1.0-1.2 ไมโครเมตร เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ เคลื่อนที่ได้หรือไม่ได้ จัดอยู่ในสกุล *Rhodomicrobium*
1. เซลล์มีรูปร่างกลม โค้ง หรือเป็นท่อนตรง เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.7 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ หรือไม่ได้ จัดอยู่ในสกุล *Rhodocyclus* (Imhoff and Truper, 1989)

ในการจำแนกระดับชนิดจะใช้สมบัติทางสรีรวิทยา เช่นความแตกต่างของการใช้สารอาหารมาจัดจำแนกเชื้อ และปัจจุบันมีการใช้สมบัติทางเคมี (chemotaxonomic method) เช่นโครงสร้างของลิโปพอลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ของ ไลปิด เอ (Weekesser *et al*., 1974) องค์ประกอบและชนิดของ ไลปิดที่มีขั้ว (polar lipid) กรดไขมัน และ ควิโนน (Imhoff *et al*., 1982) เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียเพอเพิลที่ไม่ใช้ซัลเฟอร์ ในระดับชนิดด้วย ในการศึกษาสมบัติด้านเคมีมักใช้ร่วมกับผลจาก 16S rRNA เพื่อความแม่นยำในการจัดจำแนกระดับชนิด

ผลจากวิธีการทางเคมีและลำดับเบสของ 16S rRNA นี้ทำให้มีการย้ายหรือเปลี่ยนแปลงสกุลแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น การย้าย *Rhodocyclus gelatinosus* มาอยู่ใน *Rubrivivax gelatinosus* (Willems *et al*., 1991) ซึ่งแตกต่างจาก *Rhodocyclus* อื่นๆ ที่ S_{AB}-level (ลำดับเบสของ 16S rRNA ภายในกลุ่มหลัก 3 กลุ่มคือ เอลฟา เบต้า และแกรมมา ของแบคทีเรียแกรมลบ) มีค่าประมาณ 0.3 (Gibson *et al*., 1979) และไม่พบ cytochrome C_2 ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงชนิดนี้ แต่พบ C_{551} ซึ่งพบเฉพาะใน เพอเพิลซัลเฟอร์แทน (Amber *et al*., 1979) ส่วน lipid A ของ *Rhodocyclus* จะมีปริมาณฟอสเฟตมากและมี 3-OH-myristic acid, 3-OH-capric acid ซึ่งไม่พบใน แบคทีเรียเพอเพิลไม่ใช้ซัลเฟอร์ อื่น และมีกรดลอริกแทนที่ กรดปาล์มมิติก (Weekesser *et al*., 1977)

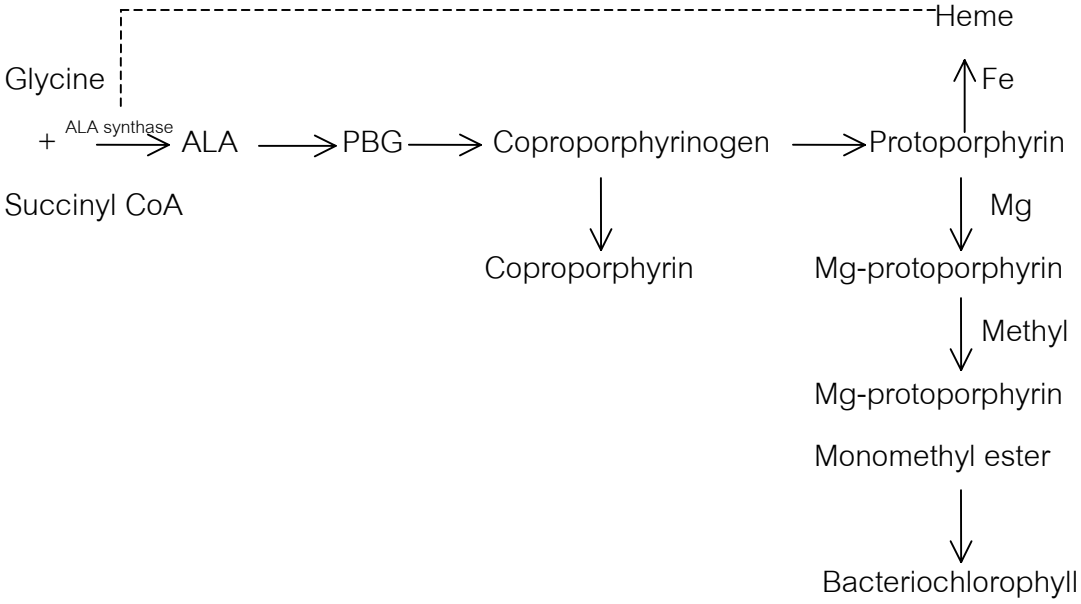
3. วิถีในการสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA)

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก เป็นกรดอะมิโนที่มี 5 คาร์บอนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เตตราไพโรล เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิริน ฮีม ยูบิควิโนน ซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช สัตว์ สาหร่าย และแบคทีเรีย ในการสังเคราะห์ ALA สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิถี ได้แก่

1.0 วิถี C_4 (Shemin pathway)

การสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกในวิถี C_4 ส่วนใหญ่พบในยีสต์ เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ proteobacteria เช่น *Rhodobacter* และ *Bradyrhizobium* สำหรับขั้นตอนการสังเคราะห์ ALA (รูปที่ 1) เริ่มต้นจาก succinyl Co A ซึ่งเป็นสารตัวกลางของวัฏจักร

เครบทำปฏิกริยากับกรดอะมิโนไกลซีน ได้ alpha-amino-beta-ketoadipic acid ซึ่งเป็นสารไม่อยู่ตัวจึงเปลี่ยนไปเป็น 5 - aminolevulinic acid (ALA) โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthetase และ cofactor pyridoxal phosphate โดยที่ขบวนการที่กล่าวมาแล้วนี้ต้องการแสง (Gibson *et al*., 1958) จากนั้น ALA จะเปลี่ยนเป็น porphobilinogen (PBG) ซึ่งเป็นสารพวก monopyrole โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ ALA dehydratase พร้อมกับสูญเสียน้ำออกไป 2 โมเลกุล PBG เปลี่ยนต่อไปเป็น Urogen III โดยอาศัยเอนไซม์ Urogen I synthetase และ Urogen III cosynthetase สาร Urogen III เป็นสาร tetrapyrole ที่ประกอบด้วย 4 acetic และ 4 propionic side chains ขั้นต่อไปจะเกิดขบวนการ decarboxylation ของสาร Urogen III โดยเอนไซม์ UrogenIII decarboxylase จึงจะเปลี่ยน acetic acid side chains ทั้งหมดให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดสารชนิดใหม่ขึ้นเรียกว่า Coprogen III ในสภาพที่มีอากาศ Coprogen III จะเปลี่ยน Protogen IX โดยเอนไซม์ Coprogen III oxidative decarboxylase และ Protogen IX จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น Protoporphyrin IX โดยไม่ทราบชื่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา เอนไซม์ที่จะทำให้ Mg เข้าไปเกาะในโมเลกุลของ Protoporphyrin IX ได้แก่ Mg chelatase ทำให้สาร Mg-protoporphyrin IX จึงจะเปลี่ยนต่อไปเป็น Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester โดยที่หมู่ OH ของ propionic side chain ของ ring C ถูกแทนที่โดยหมู่เมทธิล การเปลี่ยนแปลงของ methyl propionic side chain โดยการกลายเป็น ring ทำให้เกิดสารใหม่เรียกว่า Protochlorophyllide ในสภาพที่มีแสง protochlorophyllide จะถูกรีดิวซ์ไปเป็น protochlorophyllide a จากนั้น protochlorophyllide a ก็จะเปลี่ยนเป็นคลอโรฟิลล์ เอ โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ Chlorophyllase จึงจะทำให้ propionic side chain ของ ring D ถูก esterified โดยไฟทอล แอลกอฮอล์



รูปที่ 1 การสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกทางวิถี C_4

Fig. 1 C_4 pathway for 5-aminolevulinic acid biosynthesis

Source : Lascelles and Hatch (1969)

3.2 **วิถี** C_5 (C_5 pathway)

พบในคลอโรพลาสต์ของพืชชั้นสูง สาหร่าย และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichai coli* และ *Salmonella typhimurium* (Kajiwara *et al*., 1994) รวมทั้งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงบางชนิด (Sasikala and Ramana, 1995) เช่น *Rhodocyclus gelatinosus, Chromatium vinosum* (Oh-hama *et al*., 1993) ขั้นตอนการสังเคราะห์ (รูปที่ 2) เริ่มจากกลูตาเมตเป็นสารตั้งต้นและเกิดปฏิกิริยา 3 ขึ้นตอนคือ ปฏิกิริยาขั้นแรกกลูตาเมตจับกับ tRNA โดยมีเอนไซม์ glutamate-$tRNA^{Glu}$ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งมี ATP และ Mg^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ ปฏิกิริยาขั้นที่สอง glutamyl-tRNA จะเปลี่ยนไปเป็น glutamate-semialdehyde (GSA) แบบเส้นตรงโดยอาศัยเอนไซม์ NADPH:Glu-tRNA (oxido) reductase (หรือที่เรียกว่า glutamyl-tRNA dehydrogenase) หรือเปลี่ยนไปเป็น GSA แบบวงแหวน (hydroxyaminotetrahydropyranone, HAT) (Jordan *et al*., 1989) สำหรับปฏิกิริยาขั้นสุดท้าย GSA เปลี่ยนไปเป็น ALA โดยเอนไซม์ GSA aminotransferase และ pyridoxal phosphate เป็นโคแฟคเตอร์

รูปที่ 2 การสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกทางวิถี C_5

Fig. 2 C_5 pathway for 5-aminolevulinic acid biosynthesis

Source : Jahn *et al*., 1992

1. คุณสมบัติของเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก

4.1 5-Aminolevulinate synthase (ALAS)

เอนไซม์ ALAS มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการรวมของไกลซีนและซัคซินิลโคเอ ได้เป็น CoA, คาร์บอนไดออกไซด์ และ ALA (Jordan, 1991) โดย ALA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เตตราไพโรลในสิ่งมีชีวิตต่างๆ

$$\text{Glycine + Succinyl Co A} \leftrightarrow \text{Co A + } CO_2 \text{ + ALA}$$

การสังเคราะห์โปรตีนตั้งต้นของพวกยูคารีโอตเกิดขึ้นในไซโตซอลก่อนและย้ายไปยังไมโทคอนเดรียเมื่อมีการกำจัด presequence จะได้เอนไซม์ ALAS ที่สมบูรณ์และเคลื่อนที่ไปอยู่ในชั้น periphery ของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นใน (Gregory *et al*., 1999 อ้างโดย Hunter *et al*., 1999)

ในสัตว์พบว่ามียีนควบคุมเอนไซม์ ALAS คือ ALAS 1 และ ALAS 2 ซึ่ง ALAS 1 เป็น housekeeping gene ที่ควบคุมการแสดงออกในเนื้อเยื่อทั้งหมด ส่วน ALAS 2 จะควบคุมการแสดงออกในเม็ดเลือดแดง ALAS 2 ประมาณ 90% พบในฮีมซึ่งอยู่ในร่างกายมนุษย์ หากร่างกายขาดยีน ALAS 2 จะมีผลเกี่ยวข้องกับโรค X-link sideroblastic anemia syndrome, a erythropoietic disorder (Cotter *et al*., 1992 อ้างโดย Hunter *et al*., 1999) สำหรับการทำงานของเอนไซม์ ALAS ต้องการ pyridoxal phosphate (PLP) ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ที่มีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา transaminase ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวกับการย้ายหมู่ NH_2 จากกรดอะมิโนชนิดหนึ่งไปให้กับ α-keto acid อีกชนิดหนึ่งทำให้ได้กรดอะมิโนชนิดใหม่เกิดขึ้น และกรดอะมิโนเดิมเปลี่ยนไปเป็น keto acid ในปฏิกิริยา PLP ทำหน้าที่เป็น active site ของเอนไซม์ transaminase แล้วเกิดการ condensation ขึ้นระหว่างกรดอะมิโนและอัลดีไฮด์ ของ PLP ทำให้เกิด Schiff-base (C-C=N-CH$\longrightarrow$ -C-N=CH-) สาร intermediate ที่เกิดขึ้นนี้จะปล่อย keto acid ออกมาเหลือ เอนไซม์จับกับ pyridoxine phosphate ซึ่งเป็นตัวพากลุ่ม NH_2 ที่จะไปทำปฏิกิริยากับ keto acid ตัวใหม่แล้วเกิด Schiff-base ขึ้นอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นจะถูก hydrolysed ให้ PLP ออกมาโดยที่ keto acid ชนิดหลังจะถูก hydrolysed ให้ PLP ออกมาโดยที่ keto acid ชนิดหลังที่เข้าไปทำปฏิกิริยาด้วยจะเปลี่ยนไปเป็น non-essential amino acid (สมทรง เลขะกุล, 2543)

เอนไซม์ ALAS ที่แยกได้จากแหล่งต่างกันจะมีคุณสมบัติบางอย่างใกล้เคียงกัน เช่น เอนไซม์ ALAS ที่ได้จาก *Micrococcus denitrificans* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68000 ดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ ALAS ที่ได้มาจาก *Rhodobacter sphaeroides* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 57000 ดาลตัน (Warnick and Burnham, 1971) และโครงสร้างของเอนไซม์ทั้ง 2 แหล่งจะประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 1 เส้น สำหรับเอนไซม์ ALAS ที่ได้มาจากไมโทคอนเดรียในตับหนูจะมีขนาดใหญ่มาก มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 115,000 ดาลตัน (Hayashi *et al*., 1970) แต่ใน reticulocytes ของกระต่ายมีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 20,000 ดาลตัน (Aoki *et al*., 1971) นอกจากนี้ ใน *Micrococcus denitrificans, Rhodobacter spheroides* (Warnick and Burnham, 1971) และ reticulocytes ของกระต่าย (Aoki *et al*., 1971) มีค่า Km ของปฏิกิริยาการรวมกันของซัคซินิลโคเอและไกลซีน และมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปเอนไซม์ ALAS จากแหล่งต่างๆ ทั้งหมดถูกยับยั้งโดย haemin ที่ความเข้มข้นต่ำๆ และโดย protoporphyrin ที่ความเข้มข้นปานกลาง ยกเว้นจาก *Synechocystis itersonit* ไม่ถูกยับยั้งโดย haemin (Ho and Lascelles, 1971) ส่วนเอนไซม์ ALAS ที่ได้จาก *Micrococcus denitrificans* จะถูกยับยั้งโดย 1,10-phenanthroline ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ ALAS มีโลหะเป็นองค์ประกอบ (Tait, 1973)

1.0 5-Aminolevulinic acid dehydratase (ALAD)

เอนไซม์ ALAD มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 285,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 8 หน่วยย่อย ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000 ดาลตัน สำหรับหน้าที่ของเอนไซม์ ALAD คือเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ ALA 2 โมเลกุลไปเป็น porphobilinogen (PBG) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เตตราไพโรล เช่น ฮีม, ไซโตโครม คลอโรฟิลล์ และคอริน (Rainer, 1995) โดยสารเตตราไพโรลเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของการสังเคราะห์แสง เตตราไพโรลแต่ละชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและคอนจูเกชั่น โดยการจับกับโลหะอิออนได้หลายชนิดซึ่งอยู่ในรูป prosthetic groups (Natalie, 1996)

แหล่งที่พบเอนไซม์ ALAD เช่น ตับหมู, เม็ดเลือดแดงของมนุษย์, เชื้อ *Rhodopseudomonas capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Escherichia coli* และผักขม (*Spinacia oleracea*) (Natalie, 1996) โดยเอนไซม์ที่ได้จากแหล่งต่างๆเหล่านี้จะมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาเหมือนกัน แต่ลักษณะของโครงสร้างปฐมภูมิต่างกันขึ้นอยู่กับความต้องการโลหะอิออนและการไวต่อหมู่ไธออล ได้มีรายงานว่าเอนไซม์ ALAD ต้องการโลหะอิออน 2 ชนิดคือ Zn^{2+} และ Mg^{2+} เอนไซม์ ALAD ที่ต้องการ Zn^{2+} พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มี พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 6.3-7.1 และต้องมี Zn^{2+} อยู่ในบริเวณเร่งจึงจะมีกิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาสูงสุด นอกจากนี้เอนไซม์ ALAD ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* และยีสต์ จัดอยู่ในประเภทนี้ด้วย คือต้องการ Zn^{2+}ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงเป็นด่างคือ ประมาณ 9.8 ส่วนเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 8.0 อย่างไรก็ตามพีเอชมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โดยจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเกิดปฏิกริยา

ในสัตว์ ยีสต์ และเชื้อ *E. coli* เอนไซม์ ALAD มีโครงสร้างเป็น homo-octameric และมีหมู่ไธออล ซึ่งมีความไวสูงต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น มีผลทำให้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง และสูญเสียความสามารถในการจับโลหะอิออนได้

สำหรับเอนไซม์ ALAD ที่ต้องการ Mg^{2+} พบในพืช และมีรายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 8-8.5 และมีโครงสร้างเป็น homohexameric และมีความไวต่อ ปฏิกริยาออกซิเดชั่นน้อยกว่าเอนไซม์ ALAD ที่ได้จากสัตว์

1.0 Glutamyl-t RNA synthetase (GluRS)

GluRS จัดอยู่ในประเภท aminoacyl-tRNA synthetases และมีความสำคัญในการสังเคราะห์ ALA ผ่านทางวิถี C_5 มีหน้าที่ให้ glutamate รวมกับ t RNA^{Glu} ได้เป็น Glu-$tRNA^{Glu}$ และต้องมี ATP ร่วมด้วย เอนไซม์ GluRS ถูกควบคุมโดยการยับยั้งแบบย้อนกลับของสารเมตาบอไลซ์ ได้มีการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ GluRS ในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* โดยฮีม พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้ง 90% ที่ความเข้มข้นของฮีม 5 ไมโครโมลาร์ และในสาหร่าย *Scenedesmus* เอนไซม์จะถูกยับยั้งประมาณ 83 % โดย protochlorophyllide C ที่ความเข้มข้น 45 ไมโครโมลาร์ อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นของ

ฮีมในระดับต่ำคือมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมโครโมลาร์ ฮีมจะถูกกำจัดออกไปโดย protein-nucleic acid นอกจากนี้ยังพบว่าฮีมจะเป็นตัวยับยั้งแบบไม่จำเพาะต่อชนิดของเอนไซม์ เช่น restriction endonuclease, DNA polymerse, RNA polymerase, DNA ligase, Dnases และ transcription factor-DNA complexes เช่นใน *Synechocystis* พบว่าเอนไซม์ GluRS จะไม่ถูกยับยั้งโดยฮีมในระดับความเข้มข้นสูง (10 ไมโครโมลาร์) (Jahn *et al*., 1992)

1.0 Glutamyl-t RNA reductase (GluTR)

เอนไซม์ GluTR อาศัยโคเอนไซม์ที่อยู่ในสภาวะรีดิวซ์คือ NADPH ซึ่งเอนไซม์ GluTR มีหน้าที่เปลี่ยน Glu-tRNA^{Glu} ไปเป็น glutamate-1-semialdehyde หรือสารตัวกลางที่มีลักษณะคล้ายกัน และจะปล่อย tRNA^{Glu} อิสระออกมา เอนไซม์ GluTR จากสิ่งมีชีวิตมีลักษณะที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

จำนวนและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์จากแหล่งต่างกัน พบว่าใน *Chlamydomonas* monomer มีน้ำหนักโมเลกุล 130000 ดาลตัน ขณะที่เชื้อ *E. coli* เอนไซม์ GluTR 45 มีน้ำหนักโมเลกุล 45000 ดาลตัน และในเอนไซม์ GluTR 85 มีน้ำหนักโมเลกุล 85000 ดาลตัน สำหรับใน *Synechocystis* 6803 พบว่าเอนไซม์ GluTR สามารถทำบริสุทธิ์ได้ง่าย และมี 9 หน่วยย่อย ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39000 ดาลตัน

NADPH เป็นโคแฟคเตอร์เพียงชนิดเดียวที่มีความสำคัญต่อกิจกรรมการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์ GluTR ได้มีรายงานว่าโครงสร้างของ glutamate-1-semialdehyde ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ GluTR โดยโมเลกุลแบบเส้นตรงจะมีความเสถียรมากกว่าแบบวงแหวน

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเอนไซม์ glutamyl-tRNA reductase บริสุทธิ์

Table 1 The purified enzymes and characterized of glutamyl-tRNA reductase

Organism	Subunit molecular mass (Da)	Quaternary structure
C. reinhardtii	130000	α
E. coli	85000	α
S. typhimurium	46080	-
B. subtilis	51800	-
C. vibrioforme	46174	-

Source : Jahn *et al*., 1992

4.5 Glutamate-1-semialdehyde 2, 1 aminomutase

เอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่ในการเปลี่ยน GSA$\rightarrow$ ALA โดยปฏิกิริยา transamination ซึ่งจะต้องมี pyridoxal 5'-phosphate (PLP) หรือ pyridoxamine 5'-phosphate (PAP) เป็นโคเอนไซม์และมีการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์จากแบคทีเรียและคลอโรพลาสต์ของพืชชั้นสูงพบว่าเอนไซม์จากทั้ง 2 แหล่งมีโครงสร้างแบบ dimeric ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45000-46000 ดาลตัน (Jahn *et al*., 1992)

5. ปัจจัยสำคัญในการควบคุมการผลิต 5-อะมิโนลีวูลินิกแอซิด

5.1 แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

Sasaki และคณะ (1990) ศึกษาการผลิต ALA โดยใช้กรดไขมันระเหย เช่น กรดอะซิติก, โพรพิโอนิกและบิวทิริก ซึ่งได้มาจากน้ำหมักมูลสุกรเป็นแหล่งคาร์บอน และหากเติมกรดลีวูลินิกร่วมกับไกลซีนพบว่าสามารถผลิต ALA ได้ถึง 4.2 มิลลิโมลาร์ (0.63 กรัม ALA ต่อลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter sphaeroides* ใช้กรด

โพรพิโอนิกในการผลิต ALA มากกว่ากรดอะซิติกเนื่องจากภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง เชื้อใช้กรดโพรพิโอนิกที่มีในน้ำหมักผลิต ALA โดยสังเคราะห์ผ่านทาง methylmalonyl Co A pathway : Propionic acid → propionyl CoA → methylmalonyl CoA → Succinyl Co A → ALA

Tanaka และคณะ (1994) ศึกษาการใช้กรดไขมันระเหยจากการหมักน้ำเสียซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมี คือ ไนโตรเจนทั้งหมด 7340 มิลลิกรัม/ลิตร และมีกรดไขมันระเหย ได้แก่ อะซิเตท 1500 มิลลิกรัม/ลิตร โพรพิโอเนต 1600 มิลลิกรัม/ลิตร บิวทิเรท 450 มิลลิกรัม/ลิตร และไอโซ-บิวทิเรท 400 มิลลิกรัม/ลิตร โดยหมักเป็นเวลา 5 วัน ที่ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง (5 klux) ร่วมกับการเติมกรดลีวูลินิก 30 มิลลิโมลาร์ 3 ครั้ง และไกลซีน 60 มิลลิโมลาร์ 1 ครั้ง พบว่าเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* สามารถผลิต ALA ได้สูงถึง 9.2 มิลลิโมลาร์

5.2 สารตั้งต้น

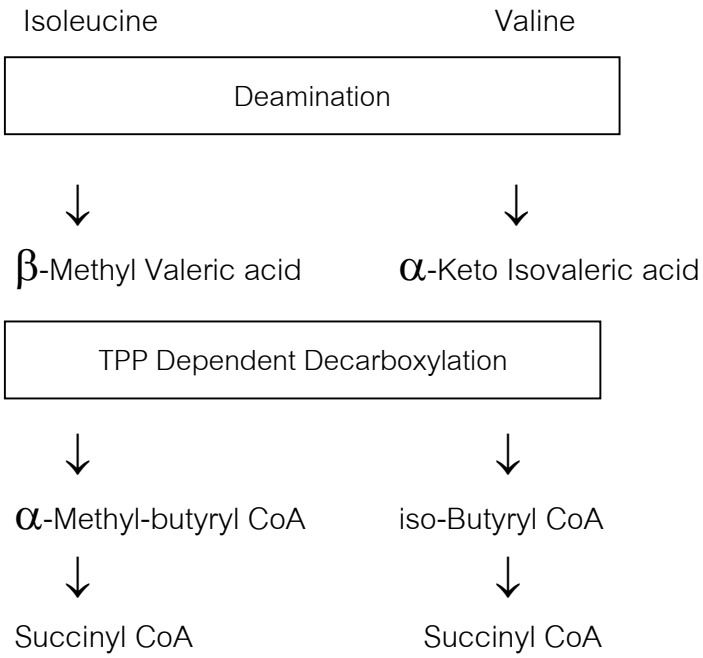
ไกลซีนและซัคซิเนตเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ ALA ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ที่ไม่ให้ออกซิเจนและเพอเพิลที่ไม่ใช่ซัลเฟอร์ ส่วนกลูตาเมตเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ALA ในพืช และสาหร่าย Sasaki และคณะ (1987) เลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์ IFO 12203 ในน้ำหมักมูลสุกรเพื่อผลิต ALA พบว่าการเติมซัคซิเนต 30 มิลลิโมลต่อลิตร และไกลซีน 30 มิลลิโมลต่อลิตร สามารถผลิต ALA ได้สูงถึง 2 มิลลิโมลต่อลิตร ส่วน Sasaki และคณะ (1990) ใช้น้ำทิ้งหลังการหมักแก๊ส 5-7 วัน ของโรงเรือนสุกรเลี้ยง *R. sphaeroides* ภายใต้สภาวะไร้อากาศ -ให้แสง 5000 ลักซ์ เพื่อผลิตสาร ALA พบว่าการเติมกรด ลีวูลินิก 3 ครั้งๆ ละ 30 มิลลิโมลต่อลิตรและไกลซีน 60 มิลลิโมลต่อลิตร 1 ครั้ง เชื้อสามารถเพิ่มการผลิต ALA สูงถึง 4.2 มิลลิโมลต่อลิตร (0.63 กรัมต่อลิตร)

Sasaki และคณะ (1995) เลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ในสภาวะมีแสงและไร้แสง เพื่อศึกษาการผลิต ALA โดยเติมสารตั้งต้น ได้แก่ โซเดียมกลูตาเมต, ไกลซีน และ โซเดียมซัคซิเนต ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลต่อลิตร และเติมกรดลีวูลินิก 20 มิลลิโมลต่อลิตร 3 ครั้ง พบว่า การเจริญและการผลิต ALA เพิ่มขึ้นเมื่อสารตั้งต้นเป็นกลูตาเมตโดยผลิต ALA ได้เท่ากับ 1.94 มิลลิโมลาร์ ขณะที่การเติมซัคซิเนตและไกลซีน จะยับยั้งการเจริญและการผลิต

ALA แสดงว่าการผลิต ALA ของ *Chlorella* sp. เกิดขึ้นโดยวิถี C_5 ภายใต้สภาวะมีอากาศและ/หรือไม่มีอากาศ

5.3 แหล่งอาหารเสริม

การเจริญและการผลิต ALA ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงพบว่าต้องการแหล่งอาหารเสริม เช่น ไธอามิน ไบโอติน เป็นต้น โดยไธอามินเป็นวิตามินที่เป็นต้นกำเนิดของโคเอนไซม์ไธอามีนไพโรฟอสเฟต (thiamin pyrophosphate : TPP) ในปฏิกิริยาการสลาย C-C ของ α-keto acid การเปลี่ยนไธอามินไปเป็น TPP ได้โดยใช้ Mg^{2+} และ ATP-dependent thiamin pyrophosphokinase อณูของ TPP มี active site อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในวงแหวน thiazole คือมีประจุเป็นลบ อณูของ thiazole จะเป็นศูนย์กลางของ phosphorylation และเป็น active site ของ thiamin อณูของ pyrimidine มีความจำเป็นในการทำหน้าที่โคเอนไซม์ TPP ทำหน้าที่ในปฏิกิริยา 2 ชนิดคือทำน้าที่เป็น active aldehyde transfer โดยต้องมี Mg^{2+} ทำงานร่วมด้วย ซึ่งหน้าที่ของ TPP ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ALA คือ การเกิดปฏิกิริยา oxidative decarboxylation ของกรด α-ketoglutaric โดยเอนไซม์ α-ketoglutarate ไปเป็น succinyl CoA และสารนี้จะไปรวมกับไกลซีน ได้เป็น ALA นอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยา oxidative decarboxylation ของ α-keto acid derivatives α-keto acid derivatives บางชนิดเช่น isoleucine และ valine ซึ่งเป็นพวก branched-chain α-keto acid ที่นำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน ในกระบวนการก็จะเปลี่ยนกรดอะมิโนเหล่านี้ไปเป็น α-keto acid แล้วตามด้วย deamination ดังแสดงในรูปที่ 3 (สมทรง เลขะกุล, 2543)



รูปที่ 3 ปฏิกิริยา Oxidative decarboxylation ของ α-keto acids

Fig. 3 Oxidative decarboxylation branched-chain α-keto acids

Source : Comb , 1992 (อ้างโดย สมทรง เลขะกุล, 2543)

ไบโอตินมีหน้าที่เป็น prosthetic group ของเอนไซม์ที่จะเป็นตัวพาคาร์บอนไดออกไซด์ไปส่งต่อให้กับสารที่ต้องการ สำหรับไบโอตินที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ALA ได้แก่ การเกิดปฏิกริยาโดย Propionyl CoA carboxylase เอนไซม์นี้เป็น biotin-dependent carboxylase ที่ใช้ในการสังเคราะห์ methylmalonyl CoA จากการเติม CO_2 ให้กับ propionyl CoA ที่ได้จาก propionic acid จากการสลายของกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนเลขคี่ ต่อจากนี้ methylmalonyl CoA มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น succinyl CoA ซึ่งจะไปรวมกับไกลซีนได้เป็น ALA (สมทรง เลขะกุล, 2543)

มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodopseudomonas spheroides* ที่เจริญในที่มีแสง และในอาหารที่ไม่มีการเติมไบโอตินไม่สามารถสร้าง coproporphyrin หรือ bacteriochlorophyll จาก α-oxoglutarate และไกลซีน (Lascelles,1956)

Gibson และ Tait (1956) พบว่าไบโอตินมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ ALA จากไกลซีนและซัคซิเนต โดยการเปลี่ยนเป็น succinyl-CoA ซึ่งไม่ใช้เอนไซม์ α-oxoglutaric acid dehydrogenase แต่อาศัยเอนไซม์ succinyl thiokinase ซึ่งอาจเป็นเพราะไบโอตินเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการรวมกันของ ซัคซินิลโคเอ และ ไกลซีน นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่ไม่มีการเติมไบโอตินเชื้อจะลดการสังเคราะห์พอไพรินและลดกิจกรรมเอนไซม์ ALAS และกิจกรรมของเอนไซม์ ALAS จะลดลงหากมีการเติม ซัคซินิล โคเอ, ไกลซีน, ไพริดอกซัลฟอสเฟต และไม่มีการเติมไบโอติน แต่ถ้าในอาหารมีไบโอติน 2 ไมโครโมลาร์ พบว่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALAS ในระดับปกติแต่จะไม่มีการสังเคราะห์พอไพรินหรือแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์แต่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์พอไพรินได้เมื่อมีการเติม ethionine ที่ความเข้มข้น 0.001-0.0001 โมลาร์

5.4 โลหะอิออน

โลหะอิออนมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งโลหะอิออนบางชนิดสามารถกระตุ้นกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่โลหะอิออนบางชนิดก็มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เช่นกัน Nalalie (1996) พบว่าเอนไซม์ ALA dehydratase มีความต้องการโลหะอิออน 2 ชนิดคือ Zn^{2+} และ Mg^{2+} ต่อการทำงานของเอนไซม์โดยได้ทำการศึกษาในเชื้อ *Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae* และในถั่ว *Pisum sativum* เอนไซม์ ALAD ที่ได้จากเชื้อ *Escherichia coli* จะมีโลหะอิออน Zn^{2+} 2 ตัวจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่ง α และ β สำหรับตำแหน่ง α ที่มี Zn^{2+}จับอยู่อาจแทนที่โดยโลหะอิออน Mg^{2+} หาก Zn^{2+} ย้ายไปอยู่ในตำแหน่ง β แต่ Mg^{2+} จับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งจำเพาะและอยู่ในรูปของ Mg_c สำหรับเอนไซม์ ALAD ที่ได้จากถั่ว *Pisum sativum* มีความจำเพาะต่อโลหะอิออน Mg^{2+} เท่านั้นจึงจะมีกิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาสูงสุดและหากเอนไซม์จับกับ Zn^{2+} พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้สูญเสียกิจกรรมในการเร่ง ปฏิกิริยา

เหล็ก

เหล็กเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ iron porphyrin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์และสารประกอบอื่นที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบของแบคทีเรียพวกเพอร์เพิลไม่ใช้ซัลเฟอร์ (Lascelles, 1960 อ้างโดย Shipman *et al*., 1977)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงต้องการธาตุเหล็กประมาณ 0.2 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร อาหาร (Hunter, 1946) การเติมเหล็กลงไปในอาหารจะทำให้การสังเคราะห์แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น 8-10 เท่า (Lascelles, 1956)

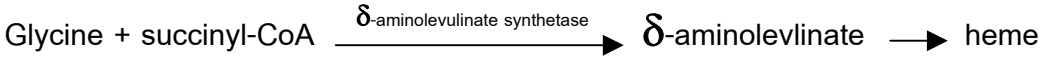
ปริมาณเหล็กที่มากเกินพอมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตรงควัตถุของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยกลไกการควบคุมแบบ negative feedback โดยเหล็กมีผลไปกระตุ้นให้มีการหลั่งพอไพรินด้วยการส่งเสริมการสังเคราะห์สารประกอบฮีม ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALA synthetase ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในกระบวนการที่สร้างกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) จากไกลซีนและซัคซินิลโคเอ จึงทำให้ไม่สามารถสร้างสารกรด 5- อะมิโนลีวูลินิก (ALA) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ใช้ในการสังเคราะห์รงควัตถุ (Burnham and Lascelles, 1963)

นอกจากนี้การเจริญและการผลิตรงควัตถุของเชื้อยังขึ้นกับการเติมเหล็กในรูปเฟอรัส (Fe^{2+}) หรือรูปเฟอริค (Fe^{3+}) การเติมเหล็กในรูปเฟอริคซิเตรท มีผลเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthetase ถึง 2.5 เท่าแต่การเติมเหล็กในรูปเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ($FeSO_4$ จาก 0.01 เป็น 0.1 มิลลิโมล) มีผลให้การทำงานของเอนไซม์ ALA synthetase ลดลง 2.18 เท่า (Burnham and Lascelles, 1963) ส่วนการเติมเฟอริคซิเตรตเข้มข้น 100 มิลลิโมล (หรือ 3.35 กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลให้ *Rhodopseudomonas sphaeroides* สร้างพอไพริน (porpyrin) ลดลงถึง 100 เท่า (Lascelles, 1956) และการเติมเหล็กในรูปเฟอริคซิเตรตหรือเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นเท่ากับหรือมากกว่า 5 ไมโครโมล คิดเป็นธาตุเหล็กประมาณ 0.28 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการสร้างพอไพริน (Lascelles, 1949 อ้างโดย Shipman *et al*., 1977)

5.5 โคแฟคเตอร์

ไพริดอกซัลฟอสเฟตเป็นโคแฟคเตอร์ที่สำคัญของเอนไซม์ ALA synthetase มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮีมจากกรดอะมิโนไกลซีนและซัคซินิลโคเอ ไนโตรเจนในอณูของฮีมได้มาจากไกลซีนและคาร์บอน ในวงแหวนพอไพริน ได้มาจากซัคซินิลโคเอ การเกิดการรวมตัวของกรดอะมิโนทั้งสองชนิดเกิดขึ้นในไมโตคอนเดรียได้สาร δ-aminolevulinic acid จากการใช้เอนไซม์ ALA synthetase ที่มีไพริดอกซัลฟอสเฟตเป็นโคแฟคเตอร์

(ดังสมการ) จะเห็นว่าใน ปฏิกิริยาใช้ PLP ไปกระตุ้นไกลซีนแล้วทำให้เกิด Schiff-base ที่จะทำให้ α-carbon ของไกลซีน ไปรวมกับ carbonyl carbon ของซัคซิเนตได้ ภายหลังจากการรวมกันของไกลซีนและซัคซิเนตแล้วจะได้ α-amino-β-aminolevulinic acid ซึ่งนำไปสังเคราะห์ฮีมต่อไป



5.6 **ตัวยับยั้งเอนไซม์** ALA dehydratase

มีการศึกษาชนิดของตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ALA dehydratase (ALAD) เพื่อให้มีการผลิต ALA ได้มากขึ้น โดยมีการทดสอบสารที่มีโครงสร้างบางส่วนคล้าย ALA กับเอนไซม์ ALAD Natalie และคณะ (1996) พบว่ากรดลีวูลินิกเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันกับเอนไซม์ ALAD จากเชื้อ *Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae* และถั่ว *Pisum sativum* ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ ALAD เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวม ALA 2 โมเลกุลไปเป็น porphobilinogen โดยจุลินทรีย์จะปล่อย ALA ในไมโทคอนเดรียออกมาอยู่ในไซโตซอล ดังนั้นจึงมีการเติมกรดลีวูลินิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มการผลิต ALA ในเชื้อต่างๆ เหล่านี้ได้แก่ *Chlorella vulgaris* (Beale, 1970), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Jaenchen *et al*., 1981) *Clostridium thermoaceticum* (Koesnandar *et al*., 1989) และ *Methanosarcina barkeri* (Lin *et al*., 1989)

Sasaki และคณะ (1987) พบว่าการเติมกรดลีวูลินิกปริมาณ 10-25 มิลลิโมลต่อลิตรในระยะกึ่งกลางการเจริญสูงสุดในการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* ในอาหารกลูตาเมต-มาเลต ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ มีผลชะลอการเจริญของเชื้อ แต่ส่งเสริมการหลั่ง ALA ออกมานอกเซลล์มากขึ้นและได้สาร ALA สูงสุดเท่ากับ 0.26 มิลลิโมลต่อลิตร เมื่อเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลต่อลิตร

Sasaki และคณะ (1997) ได้เลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์ IFO 12203 ในอาหารที่มีกลูตาเมต-มาเลต ปรับพีเอช 5.5 เติมกรดลีวูลินิก 5 มิลลิโมลาร์ พบว่ากรดลีวูลินิกจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ALAD ได้สูงถึง 85% นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า

การเติมกรดลีวูลินิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เอนไซม์ ALAD ลดลงอย่างรวดเร็ว ประมาณ 30-50% ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง และหลังเติมกรดลีวูลินิก 60-90 ชั่วโมงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALAD เพิ่มขึ้น ดังนั้นการรักษาระดับเอนไซม์ ALAD ให้อยู่ในระดับต่ำจึงต้องมีการเติมกรดลีวูลินิกเป็นช่วงๆ อย่างต่อเนื่องและมีการเติมในปริมาณเพียงเล็กน้อย เนื่องจากกรดลีวูลินิกมีราคาแพง

ส่วนสารอื่นๆ ที่มีผลยับยั้งเอนไซม์ ALAD ได้แก่ gabaculine ซึ่งมีการทดลองกับเอนไซม์ ALAD โดย Darweeh (1992) ศึกษาผลของสาร gabaculine ในการยับยั้งเอนไซม์ ALAD ที่ได้จากคลอโรพลาสต์ในถั่ว โดยทำการทดสอบสาร gabaculine ที่ความเข้มข้น 0, 10, 15 และ 30 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมงภายใต้สภาวะมีแสงและไม่มีแสง เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ALAD พบว่าในสภาวะมีแสง กิจกรรมของเอนไซม์ ALAD มีค่าเพิ่มขึ้น 2.7 เท่าและเมื่อทดสอบสารนาน 2 วัน สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ALAD 50% ในสภาวะมีแสง และ 30% ในสภาวะไร้แสง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pulcheria และคณะ (1994) โดยศึกษาผลของ gabaculine ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ALAD เช่นกันใช้สาร gabaculine ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ทดสอบในยอดอ่อนของ radish พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALAD ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากทดสอบสาร 24 ชั่วโมงเมื่อเจริญภายใต้สภาวะมีแสง

5.7 ความเข้มแสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงต้องการแสงเป็นแหล่งพลังงานในระหว่างการเจริญภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Sasaki *et al*., 1987) ความเข้มแสงมีผลต่อการเจริญ และการผลิต ALA Sasaki และคณะ (1990) ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการผลิต ALA จากเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* โดยมีการเติมกรดลีวูลินิก 30 มิลลิโมลาร์ และไกลซีน 60 มิลลิโมลาร์ พบว่าการผลิต ALA เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มแสงมากกว่า 5000 ลักซ์ การผลิต ALA ลดลง นอกจากนี้ชนิดของหลอดไฟก็มีผลต่อการเจริญ Kim และคณะ (1982) รายงานว่า หลอดไฟทังสเตนมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเนื่องจากการเปล่งแสงใกล้เคียงกับ infra-red (IR) ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 800-900 นาโนเมตร โดยที่ความยาวคลื่นนี้แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์จะมีประสิทธิภาพในการดูดกลืนแสงมากที่สุด

ดังนั้นเชื้อจึงมีการเจริญได้ดี ส่วน William และคณะ (1967) รายงานว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Rhodospirillum* และ *Rhodopseudomonas* จะมีการตอบสนองต่อความเข้มแสงโดยปริมาณของ intracellular membrane ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อเจริญในที่มีความเข้มแสงต่ำ เช่นเดียวกับอัตราการสังเคราะห์แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงต่ำ

5.8 ออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสร้างเซลล์และปริมาณรงควัตถุโดยออกซิเจนมีผลยับยั้งการสร้างรงควัตถุ Cohen-Bazire และคณะ (1957) เลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas sphaeroides* ที่เจริญในอาหารที่มีออกซิเจนภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง พบว่าการสังเคราะห์แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ลดลงทันทีและไม่มีการสะสมของ ALA หรือสารตัวกลางในการสังเคราะห์แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ นอกจากนี้ออกซิเจนที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งเอนไซม์ ALAS อย่างรวดเร็ว (Lascelles, 1968) ส่วน Marriott (1968) พบว่าการให้ออกซิเจนในระหว่างการเลี้ยง *R. spheroides* ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสงมีผลให้ลดกิจกรรมของเอนไซม์ ALAS 8-10 เท่า ทั้งนี้กิจกรรมของเอนไซม์ ALAS ถูกกระตุ้นโดยสารประกอบไดซัลไฟด์ และถูกยับยั้งหากในระบบการเลี้ยงมีการให้ออกซิเจนเนื่องจากออกซิเจนจะมีผลต่อการเมตาบอลิซึมของสารประกอบซัลเฟอร์โดยพบว่าเมื่อมีการให้ออกซิเจน 1 ชั่วโมง ปริมาณของ GSH+GSSG และ cysteine+cystine ภายในเซลล์ลดลงมากกว่า 10% ก่อนที่จะมีการให้ออกซิเจน (Neuberger, 1973) ซึ่งกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ ALAS จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ GSH+GSSG ภายในเซลล์ (GSH+GSSG เป็นสารประกอบไตรซัลไฟด์มีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ALAS) นอกจากนี้ออกซิเจนจะมีผลยับยั้งโฮโมซีสเตอีน (homocysteine) ไม่ให้เปลี่ยนไปเป็นเมทไธโอนีน (methionine)

5.9 พีเอช

Sasaki และคณะ (1997) พบว่าที่พีเอช 7.5 กิจกรรมของเอนไซม์ ALAD ลดลง 20% หลังจากเติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ และเอนไซม์ ALAD ลดลง 45% เมื่อเพิ่มกรดลีวูลินิกเป็น 100 มิลลิโมลาร์ สำหรับพีเอช 6.5 เอนไซม์ ALAD ลดลง

60% หลังจากเติมกรดลีวูลินิกที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ และที่พีเอช 5.5 หลังจากเติมกรดลีวูลินิก 5 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 85% ทั้งนี้กรดลีวูลินิกที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ ALAD จะอยู่ในรูปไม่แตกตัว (undissociated) และจะพบมากในอาหารที่มีพีเอชต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Noparatnaraporn และคณะ (2000) ที่ศึกษาการผลิต ALA จากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodovulum* sp. ภายใต้การควบคุมพีเอชที่พีเอช 5.5, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ในอาหารกลูตาเมต-มาเลตที่มีเกลือ 3% เลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสง 5000 ลักซ์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เติมสารตั้งต้นไกลซีน 30 มิลลิโมลาร์ ซัคซิเนต 30 มิลลิโมลาร์ และเติมกรดลีวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ 3 ครั้ง พบว่าที่พีเอช 5.8 เชื้อผลิต ALA ได้สูงสุดเท่ากับ 1.2 mM และที่พีเอชเพิ่มขึ้น การผลิต ALA ลดลง

นอกจากนี้ พีเอชมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทั่วไปพีเอชจะมีผลต่อการแตกตัวอิออน (ionization) ของ prototrophic group ที่อยู่ในบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติซึ่งมีผลไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับกับสับสเตรตหรือการเร่งปฏิกิริยา และพีเอชยังไปมีผลต่อการเกิด ES การแตกอิออนของสับสเตรต โคแฟคเตอร์ ซึ่งนำไปสู่การจับกับเอนไซม์ที่เปลี่ยนไปด้วย นอกจากนี้พีเอชยังมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ทุกชนิดเป็นโปรตีน ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ก็คือ ปัจจัยที่มีผลให้โครงสร้างของโปรตีนในระดับปฐมภูมิหรือทุติยภูมิเปลี่ยนไป เช่น กรดแก่และด่างแก่มีผลให้โปรตีนของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปเลย (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) สำหรับพีเอชที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthase (ALAS) และ ALA dehydretase (ALAD) พบว่าที่พีเอช 6.0-6.5 กิจกรรมของเอนไซม์ ALAD ถูกยับยั้ง ดังนั้นการผลิต ALA จึงลดลงด้วยเช่นกัน ที่พีเอชเป็นกลาง 6.8-7.0 กิจกรรมของเอนไซม์ ALAS มีอยู่ในระดับสูง แต่กิจกรรมของเอนไซม์ ALAD ถูกยับยั้งปานกลาง ดังนั้น ALA จึงมีการผลิตอย่างต่อเนื่อง และที่พีเอช 8.0 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALAS มีอยู่ในระดับต่ำ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ ALAD กลับเพิ่มขึ้น ดังนั้นการสังเคราะห์ ALA ในเซลล์ถูกเมตาบอไลซ์ไปเป็นสารประกอบเตตราไพโรลทำให้ มีการสะสม ALA อยู่เพียงเล็กน้อย (Sasaki *et al*., 1996)

Sasaki และคณะ (1993) ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิต ALA จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ที่มีกรดไขมันระเหยเป็นองค์ประกอบ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 6.0, 6.2, 6.5, 6.8, 7.0, 7.5 และ 8.0 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิต ALA อยู่ในช่วง 6.8 –7.0 โดยเชื้อสามารถผลิต ALA ได้เท่ากับ 16 มิลลิโมลาร์ (2.1 กรัมต่อลิตร) เมื่อผลิต ALA ภายใต้การควบคุมพีเอช (6.8 $\pm$ 0.1) โดยมีการเติมกรดลีวูลินิกและไกลซีน และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALAS และ เอนไซม์ ALAD พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALAS ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นหลังจากมีการเติมกรดลีวูลินิกขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ ALAD ถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วหลังจากเติมกรดลีวูลินิก 30 นาที โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือเพียง 15 % ทั้งนี้กิจกรรมของเอนไซม์ ALAS ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดการปลดปล่อยจากกระบวนการยับยั้งแบบย้อนกลับโดยสารประกอบพวกฮีมเพราะกรดลีวูลินิกเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันกับเอนไซม์ ALAD ดังนั้นการเกิดสารประกอบฮีมจึงมีผลให้การสะสม ALA ลดลง

ส่วนผลของพีเอชต่อความคงตัวของ ALA พบว่า ALA สลายตัวได้ง่ายที่พีเอชเป็นด่างโดยสลายไป 60% ที่พีเอช 7.5 ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* ที่ 48 ชั่วโมง แต่ ALA สลายตัวเพียง 20% ที่พีเอชต่ำกว่า 6.5

6. การประยุกต์ใช้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก

6.1 สารกระตุ้นการเจริญ (Growth stimulator)

Sasaki และคณะ (1995) ศึกษาผลของ ALA ต่อการเจริญและการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายเกลียวทอง โดยการเติม ALA 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการสะสมของไฟโคไซยานิน และคลอโรฟิลล์ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น

Hotta และคณะ (1989) ศึกษาผลของ ALA ในการส่งเสริมการเจริญของพืชหลายชนิด โดยพ่นสารละลาย ALA ลงบนใบผักกาดที่ระดับความเข้มข้น 0.06, 0.18, 0.6, 1.8 และ 6 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของ ALA 0.06-1.8 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของรากเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ มีผลให้ต้นอ่อนได้รับความเสียหาย นอกจากนี้ ALA ที่ความเข้มข้น 0.18 และ 0.6 มิลลิโมลาร์ ช่วยเพิ่มการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะมีแสง และลดการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะไร้แสง

การใช้ ALA ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.06 มิลลิโมลาร์) เพิ่มการเจริญและผลผลิตของถั่วแดง, ข้าวบาร์เล่ย์, มันฝรั่ง และ กระเทียมประมาณ 10-60% เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ได้ใช้สาร ALA

Hotta และคณะ (1997) ศึกษาผลของ ALA ต่อสรีระวิทยาของพืชโดยใช้สารละลาย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0006-600 มิลลิโมลาร์ โดยใช้วิธีแช่รากในสารละลาย พบว่าที่ความเข้มข้นของ ALA 0.06-6 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้ต้นข้าวมีการเจริญเพิ่มขึ้นในสภาวะมีแสงแต่ไม่มีผลส่งเสริมการเจริญในสภาวะไร้แสง นอกจากนี้เมื่อทดสอบใน pothos lime (*Epipremnum aureus*) พบว่าที่ความเข้มข้นของ ALA 0.06 มิลลิโมลาร์ มีการสะสมของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น แต่ในการกระตุ้นการสังเคราะห์แสงของพืชต้องใช้สาร ALA ร่วมกับสารอาหาร

Roy และคณะ (1998) ศึกษาผลของสาร ALA ต่อการเพิ่มน้ำหนักของผลผลิตในถั่วโดยวิธีการแช่เมล็ดในสารละลาย ALA ก่อนการนำไปปลูก พบว่า ALA ทำให้มีการเจริญเพิ่มขึ้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีการสะสมของวัตถุแห้ง (dry matter) ในใบ ลำต้น ฝักและปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นด้วย

Bindu และคณะ (1998) ศึกษากิจกรรมของ ALA ในการชักนำให้เกิดแคลลัสเพื่อการขยายพันธุ์พืชโดยใช้ชิ้นส่วนของใบถั่วเพาะเลี้ยงในอาหาร Murashige Skoog (MS) และมีการเติม ALA ในปริมาณ 1-10 มิลลิกรัม พบว่าทุกการทดลอง ALA มีผลชักนำให้เกิดแคลลัส ยกเว้นที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมของ ALA และที่ความเข้มข้น 5-6 มิลลิกรัม พืชมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ส่วนที่ปริมาณ ALA 7-10 มิลลิกรัมมีรากเกิดขึ้นด้วย นอกจากนี้เมื่อนำชิ้นส่วนของพืชที่ประกอบด้วยยอดและตาไปเลี้ยงในอาหาร MS และมีการเติม ALA 1-10 มิลลิกรัม พบว่ามีการพัฒนาของยอดและราก ยกเว้นที่ปริมาณ 1-2 มิลลิกรัม ที่มีการพัฒนาของรากเพียงอย่างเดียว

Virgon และ McEwen (1995) ศึกษาผลของ ALA ต่อการผลิตรงควัตถุในยอดอ่อนของถั่วภายใต้สภาวะการเจริญแบบไร้แสง พบว่าการสังเคราะห์ protochlorophyll เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ได้มีการทดลองวิธีการใช้และความเข้มข้นต่างๆ ของ ALA ในข้าว, ข้าวโพด, ถั่วแดง และ หัวผักกาด (redish) พบว่าผลของ ALA ขึ้นอยู่กับวิธีการนำไปใช้และความเข้มข้น

การนำ ALA ไปใช้โดยวิธีที่เหมาะสมทำให้มีการเจริญของพืชเพิ่มขึ้น 110-150% และความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.1-1.0 พีพีเอ็ม โดยการแช่ราก, 30-100 พีพีเอ็ม โดยการฉีดพ่น และ 10-100 กรัมต่อพื้นที่ 10 แอคเคอร์ โดยการราดลงในดิน

6.2 สารกำจัดวัชพืช (Photodynamic herbicides)

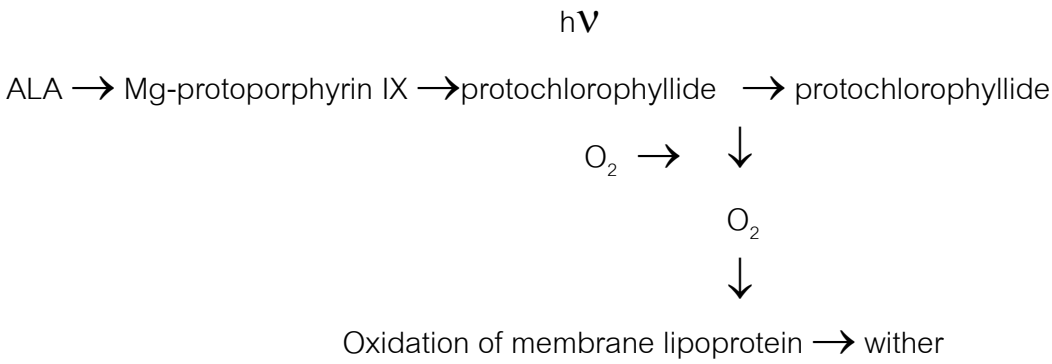
Sasaki และคณะ (1991) ทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดวัชพืช *Trifolium repens* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* 4 วัน (มีสาร ALA 4 มิลลิโมล) โดยพ่น 10 มิลลิลิตรต่อ 150 ตารางเซนติเมตร พบว่า หลังจากพ่นในวันที่ 1, 2 และ 3 ให้ค่า herbicide activity (พื้นที่ของใบพืชที่ถูกทำลายต่อพื้นที่ของใบพืชที่ดีคูณร้อย) 83, 90 และ 95 % ตามลำดับ และเมื่อเติมสาร α, α' – dipilidyl (5 มิลลิโมล) ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการออกฤทธิ์ของสารกำจัดวัชพืช ลงในน้ำหมัก มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดวัชพืชได้ถึงร้อยละ 100 (หลังการพ่น 1, 2 และ 3 วัน)

การพ่นสาร ALA บนใบวัชพืชภายใต้สภาวะไร้แสง สาร ALA เปลี่ยนรูปเป็น protochlorophyllide (รูปที่ 4) เมื่อมีแสงอาทิตย์ จะทำหน้าที่เป็นตัว photosynthesizers (เปลี่ยนเป็น triplet oxygen ที่มีศักยภาพในการออกซิไดซ์ singlet oxygen) ออกซิเจนในรูป singlet oxygen จะออกซิไดซ์อย่างรุนแรง (superoxidizes) ต่อฟอสโฟลิปิดของผนังเซลล์ของใบพืช ผนังเซลล์ถูกทำลาย วัชพืชตาย สาร ALA สามารถกำจัดวัชพืชชนิดใบเลี้ยงคู่มากกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

Hartel และคณะ (1993) ศึกษาผลของ ALA ต่อองค์ประกอบการสังเคราะห์แสงในใบข้าวสาลี และผักกาดหอมโดยใช้ความเข้มข้นของ ALA 5 มิลลิโมลาร์ ในสภาวะไร้แสง พบว่าที่ 16 ชั่วโมงใบของผักกาดหอมมีการสะสมของโปรโตคลอโรฟิลล์ลดลงต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ของใบ ใบของผักกาดหอมมีการนำ ALA ไปใช้สูงกว่า

Tripathy และคณะ (1991) ศึกษาผลของ ALA ในการชักนำให้เกิดกระบวนการ photodynamic ในใบเลี้ยงของแตงกวาโดยการพ่นสาร ALA 20 มิลลิโมลาร์ ลงบนใบแตงกวา ในสภาวะไร้แสง 14 วันหลังจากย้ายไปไว้ในสภาวะมีแสง (ประมาณ 800 วัตต์ต่อตารางเมตร) พบว่าพืชตายหลังจากได้รับแสง 5 ชั่วโมงเนื่องจากเกิดปฏิกิริยา

photosensitization จาก metalloporphyrins นำไปสู่การได้รับความเสียหายของพืชเนื่องจากกระบวนการ photodynamic



รูปที่ 4 ขั้นตอนการเกิดปฏิกริยา photodynamic herbicide

Fig.4 Reaction of photodynamic herbicide

Source : Rebeiz *et al*., 1988

6.3 สารกำจัดแมลง (Porphyric insecticides)

การค้นพบสารกำจัดแมลงเกิดขึ้นเช่นเดียวกับการค้นพบสารกำจัดวัชพืช เนื่องจากทั้ง พืช และ เซลล์สัตว์ มีวิถีการสังเคราะห์สาร เตตราไพโรลจากกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกไปเป็น protoporphyrin IX (Proto) เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงมีการพัฒนากระบวนการ photodynamic เพื่อใช้ในการควบคุมแมลง ซึ่งได้มีการทดลองในหนอนใยผัก *Trichoplusia ni* โดยพ่นสาร ALA ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ + 2,2- dipyridyl (Dpy) 30 มิลลิโมลาร์ (Rebeiz *et al*., 1988) ทิ้งไว้ 1 คืนที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการสะสมของสารเตตราไพโรล โดยเฉพาะ protoporphyrin IX (Proto) เมื่อหนอนได้รับแสงเพียงไม่กี่ชั่วโมงพบว่าหนอนมีลักษณะเฉื่อยชา และอ่อนปวกเปียกเนื่องจากมีการสูญเสียน้ำในร่างกายและตายในที่สุด

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ (mode of action) ของ porphyric insecticides ในเนื้อเยื่อภายในเซลล์พบว่า ในหนอนใยผักที่มีการพ่นสาร ALA ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิ

โมลาร์ + 2,2- dipyridyl (Dpy) 30 มิลลิโมลาร์ จะมีการสะสมของสารเตตราไพโรลใน hemolymph 59 % ในกระเพาะอาหาร 35 % และในเปลือกหุ้มลำตัว 6% (Lee and Rebeiz, 1995) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในตัวเต็มวัยของแมลงสาบเยอรมัน (*Blattella germanica*) ตัวเต็มวัยของด้วงเจาะสมอฝ้าย (*Anthonomus grandis*) ตัวอ่อนระยะที่ 5 ของหนอนเจาะข้าวโพด (*Heliothus zea*) และหนอนใยผัก พบว่าจะมีการสะสมของ Proto ในกระเพาะและไขมันในร่างกายของแมลง ทั้งนี้การสะสมของ Proto จะเกิดขึ้นเมื่อเนื้อเยื่อได้รับ Dpy, ALA+Dpy, 1,10-phenanthroline (Oph), และ Oph+ALA (Lee and Rebeiz, 1995)

6.4 สารยับยั้งการเกิดมะเร็ง (Photodynamic cancericides)

การศึกษาคุณสมบัติของกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกในการเป็น photodynamic เพื่อทำลายเซลล์มะเร็ง Svanberg และคณะ (1994) ได้ทดลองให้ ALA ทางผิวหนังที่มีบาดแผลแก่ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งผิวหนัง พบว่า ALA สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ การให้ ALA แก่ผู้ป่วยทางผิวหนัง, ทางปาก หรือทั้ง 2 จะมีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็ง (Kennedy *et al*., 1990) นอกจากนี้ ALA ยังสามารถรักษาโรค amelanotic melanomas (Abels *et al*., 1994), มะเร็งที่ตับอ่อน (Regula *et al*., 1994) และมะเร็งลำไส้ (Orth *et al*., 1994)

ในการใช้ ALA ในการรักษามะเร็ง จำเป็นต้องทราบคุณสมบัติซึ่งพบว่า ALA เป็นสารที่ละลายน้ำได้เล็กน้อย สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ง่าย (Van der Veen *et al*., 1994) และง่ายที่เซลล์จะเปลี่ยนรูป ALA (Bedwell *et al*., 1992)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มที่สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก
1. เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มที่คัดเลือกได้
1. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อที่คัดเลือกได้

ขอบเขตการวิจัย

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม 5 สายพันธุ์ที่ผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูงสุด ในอาหารกลูตาเมต-มาเลต ที่มีเกลือ 3% จำแนกชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้ และศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ได้แก่ ผลของการเติมกรดลีวูลินิก, กลูตาเมต กรดมาลิก ไกลซีน ซัคซิเนต กรดไขมันระเหย แมกนีเซียมคลอไรด์ ไพริดอกซัลฟอสเฟต หาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม และผลของการควบคุมพีเอช รวมทั้งศึกษาระบบเอนไซม์ภายในเซลล์ของเชื้อและกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกภายในและภายนอกเซลล์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มที่ผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้สูง
1. ทราบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกของเชื้อที่คัดเลือกได้
1. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับวิจัยและพัฒนาในขั้นต่อไป