

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกชนิดหลังออก  
ภายนอกเซลล์โดย *Rhodopseudomonas palustris* LBL15 ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง  
Optimization of Culture Conditions for Extracellular 5-Aminolevulinic Acid Production by  
*Rhodopseudomonas palustris* LBL15 Using Response Surface Methodology

พิชิต โชดก\*

Pichit Chodok\*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

Program of plant production technology, Faculty of Science and Technology, Phranakorn Si Ayutthaya Rajabhat University

Received : 11 April 2017

Accepted : 27 June 2017

Published online : 19 July 2017

**บทคัดย่อ**

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ (ALA) โดย *Rhodopseudomonas palustris* LBL15 ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อประเมินผลของกรดลิวูลินิก พีเอช ซักซิเนต ไกลซีน และอะซิเตตต่อการเพิ่มผลผลิต ALA ซึ่งพบว่ากรดลิวูลินิก พีเอช และไกลซีนส่งผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการผลิต ALA ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่ซักซิเนตและอะซิเตตไม่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อการผลิต ALA โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีค่าเท่ากับ 0.9750 โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ALA คือ กรดลิวูลินิก 12.81 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.58 ซักซิเนต 16.28 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน 11.03 มิลลิโมลาร์ และอะซิเตต 1.98 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิต ALA สูงสุดเท่ากับ  $40.32 \pm 0.43$  มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าการผลิต ALA ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย (41.28 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีค่ามากกว่าสภาวะที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุงถึง 4 เท่า ( $10.12 \pm 0.62$  มิลลิกรัมต่อลิตร ALA) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลองจริงกับค่าที่ได้จากการทำนาย พบว่ามีค่าความผิดพลาดของการผลิต ALA เท่ากับ 2.33 เปอร์เซ็นต์

**คำสำคัญ** : กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก แบคทีเรียสังเคราะห์แสง วิธีพื้นผิวตอบสนอง

**Abstract**

The objective of this research was to investigate the optimum culture conditions for enhancing the production of extracellular 5-aminolevulinic acid (ALA) from *Rhodopseudomonas palustris* LBL15 by Response Surface Methodology (RSM) to evaluate the effects of levulinic acid, pH, succinate, glycine, and acetate on enhancing the production of ALA. It was found that the levulinic acid, pH and glycine presented the most significant effect on ALA production ( $P < 0.05$ ), while the succinate and acetate were not significant. The coefficient of determination ( $R^2$ ) of the mathematical model was 0.9750. Regression analysis indicated that the optimal values of

\*Corresponding author. E-mail : pichit\_chodok@yahoo.com

these variables were determined as: levulinic acid 12.81 mM, pH 6.58, succinate 16.28 mM, glycine 11.03 mM and acetate 1.98 mg/L. Under these optimal culture conditions, the maximum ALA production was  $40.32 \pm 0.43$  mg/L that showed a promising agreement with the predicted value (41.28 mg/L ALA), and pronounced 4 times higher than that of unoptimized experiment ( $10.12 \pm 0.62$  mg/L ALA). Comparison of the experimental values with those of the predicted values was almost identical with low percentage error of ALA production of 2.33%.

**Keywords :** 5-aminolevulinic acid, photosynthetic bacteria, response surface methodology

## บทนำ

กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก (5-aminolevulinic acid, ALA) จัดเป็นสารตัวกลางในกระบวนการชีวสังเคราะห์เตตราไพโรล ได้แก่ ฮีม วิตามินบี 12 ฟอร์โฟริน และคลอโรฟิลล์ (แบคทีเรียโคลอโรฟิลล์) (Tangprasittipap *et al.*, 2007) ในปัจจุบันมีการรายงาน ว่า ALA ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ (Grigalavicius *et al.*, 2017) เกษษกรรม (Bragagni *et al.*, 2015) เครื่องสำอาง (An *et al.*, 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางการเกษตร พบว่ามีการใช้ ALA เป็นสารกำจัดวัชพืชและแมลงศัตรูพืช ชนิดที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable herbicide and insecticide) (Chakraborty & Tripathy, 1992; Sasikala *et al.*, 1994) และสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Xie *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2017) รวมทั้งทำให้พืช ปลูกทนต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ (Akram & Ashraf, 2013) สาร ALA สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในกลุ่ม purple non-sulfur bacteria (PNSB) ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิต ALA ออกภายนอกเซลล์ใน ปริมาณที่สูง (Sasikala *et al.*, 1994) จากคุณสมบัติของ ALA ในทางการเกษตรที่มีมากขึ้น ส่งผลให้งานวิจัยต่าง ๆ มุ่งเน้น พัฒนาการะบวนการผลิต ALA โดยมีรายงานการผลิต ALA ด้วยกระบวนการทางเคมี แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าว นั้น มีขั้นตอนการผลิตหลายขั้นตอน กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์มีต้นทุนสูง และได้ผลผลิตน้อย (Sasaki *et al.*, 2002) จึงทำให้การผลิต ALA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและมีการศึกษามากขึ้น อย่างต่อเนื่อง แบคทีเรียในกลุ่ม PNSB ที่เคยมีรายงานว่าสามารถผลิต ALA ได้สูง เช่น *Rhodovulum* sp. (Noparatnaraporn *et al.*, 2000), *Rhodopseudomonas palustris* (Kantha *et al.*, 2010) และ *Rhodobacter sphaeroides* (Kars & Alparslan, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า PNSB เป็นแบคทีเรียที่สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศได้ (Choorit *et al.*, 2011) จึงเหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพและสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

การพัฒนาระบวนการผลิต ALA ด้วยกระบวนการชีวภาพมีการศึกษาผลของปัจจัยทางเคมีและกายภาพต่าง ๆ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน (Choorit *et al.*, 2011) สารยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase (ALAD, กรดลิวูลินิก) สารตั้งต้น (ซักซินเนต และไกลซีน) (Saikour *et al.*, 2009) โลหะไอออน (Tangprasittipap *et al.*, 2007) ความเข้มแสงและพีเอช (Liu *et al.*, 2015) โดยการทดลองจะเป็นแบบทีละปัจจัย (one factor at a time) เป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจโดยกำหนดให้ปัจจัยอื่น ๆ คงที่ และเมื่อได้ค่าผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนระดับของปัจจัยที่ศึกษา และเมื่อได้ผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึง เปลี่ยนไปศึกษาปัจจัยที่สอง และทำอย่างนี้ต่อไปเรื่อย ๆ จนครบทุกปัจจัยที่ต้องการศึกษา ซึ่งวิธีการทดลองในรูปแบบนี้มีการ ใช้กันอย่างแพร่หลายในการพัฒนาสูตรอาหาร และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ALA (Chung *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2006; Sonhom *et al.*, 2012) เนื่องจากมีข้อดี คือ ขั้นตอนการทดลองไม่ยุ่งยาก ในขณะที่ข้อเสีย คือ ไม่สามารถทราบ

ถึงผลของปัจจัยที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน (interaction) รวมทั้งใช้เวลานานถ้าหากทำการศึกษาในหลายปัจจัย และผลการทดลองที่ได้จากวิธีการนี้อาจจะไม่ใช่ผลการทดลองที่ดีที่สุด ซึ่งแตกต่างกับการทดลองทางสถิติเป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจ โดยการใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ใช้เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ครอบคลุม รวมทั้งลดระยะเวลา และทรัพยากรที่ใช้ในการทดลอง ตัวอย่างเช่น วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) เป็นกระบวนการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของผลตอบสนอง ซึ่งจะใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์และสถิติในการวางแผนการทดลอง ข้อดีของ RSM จะช่วยลดจำนวนชุดการทดลองทำให้สามารถศึกษาผลของปัจจัยหรือตัวแปรได้อย่างรวดเร็ว และทราบถึงผลของปัจจัยที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน มีรายงานการวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต ALA โดยใช้วิธี RSM ตัวอย่างเช่น การศึกษาการผลิต ALA ในแบคทีเรีย *R. palustris* KG31 (Saikour *et al.*, 2009; Choorit *et al.*, 2011) และ *R. sphaeroides* ATCC17023 (Liu *et al.*, 2016) จากความสำคัญของ ALA และความสามารถในการผลิต ALA ของ PNSB รวมทั้งการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ALA ในแบคทีเรียที่คัดเลือก *R. palustris* LBL15 โดยใช้วิธี RSM และออกแบบการทดลองแบบประกอบศูนย์กลาง (central composite design, CCD) ซึ่งองค์ความรู้และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปสู่การพัฒนากระบวนการผลิต ALA ในระดับอุตสาหกรรมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. สายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง การเก็บรักษา และอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* LBL15 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาข้าวในบริเวณพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สามารถผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร glutamate-malate-yeast extract (GMY) (Choorit *et al.*, 2011) พีเอช 6.5 ร่วมกับการเติมกรดลิวูลินิก 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (5,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โดยทำการคัดกรองจากแบคทีเรียทั้งหมด 480 ไอโซเลต และเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนบริเวณ 16S rDNA เก็บรักษาในอาหารแข็ง GMY โดยวิธีการ stab เก็บหลอดเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเซลล์ทุก ๆ 2 เดือน (Sasaki *et al.*, 1987) หรือเก็บไว้ในอาหารเหลว GMY ที่ประกอบด้วยกลีเซอรอล 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ALA โดยแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 ด้วยวิธี RSM

#### 2.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15

นำแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร glutamate-acetate-yeast extract (GAY) (เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากมาเลทเป็นอะซิเตท) (Choorit *et al.*, 2011) พีเอช 6.5 ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (5,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเติมอาหารเหลวตามที่ได้ออกแบบการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 เขย่าให้เซลล์กระจายในอาหาร จากนั้นนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (PerkinElmer UV/VIS spectrometer Lambda 25, USA) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปรับให้เซลล์แขวนลอยให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 1.0 ( $OD_{660} = 1.0$ ) ใช้เป็นกล้าเชื้อ

## 2.2 การผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์

ถ่ายกล้ำเชื้อจากข้อ 2.1 ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์ของกล้ำเชื้อ) ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร 36 มิลลิลิตร ตามที่ได้ออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม Design-Expert® V. 8.0.3.1 (Stat Ease Inc., MN, USA) โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 5 ปัจจัย ได้แก่ กรดลิวลินิก (5-25 มิลลิโมลาร์) พีเอช (5.5-7.5) ซักซิเนต (5-25 มิลลิโมลาร์) ไกลซีน (5-15 มิลลิโมลาร์) และอะซิเตท (1-3 กรัมต่อลิตร) และแบ่งระดับของปัจจัยออกเป็น 5 ระดับ คือ -2, -1, 0, +1 และ +2 มีจำนวนชุดการทดลองทั้งหมด 50 การทดลอง แสดงดังตารางที่ 1

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ (ตามที่ได้ออกแบบการทดลองในตารางที่ 1) ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (5,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (ทดสอบ 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง) หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำหมักไปวิเคราะห์ปริมาณ ALA เมื่อทำการทดลองตามที่ได้ออกแบบดังตารางที่ 1 นำผลการทดลองไปวิเคราะห์ผลโดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นเท่ากับหรือสูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถแสดงได้ด้วยแบบจำลองพหุนามกำลังสอง (quadratic polynomial equation) แสดงดังสมการที่ 1

$$Y_1 = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_4D + \beta_5E + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{14}AD + \beta_{15}AE + \beta_{23}BC + \beta_{24}BD + \beta_{25}BE + \beta_{34}CD + \beta_{35}CE + \beta_{45}DE + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{44}D^2 + \beta_{55}E^2 \quad (1)$$

โดยที่  $Y_1$  คือ ผลตอบสนอง  $\beta_0$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร  $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$  และ  $\beta_5$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรง  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$  และ  $\beta_{55}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้ง  $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{15}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{25}, \beta_{34}, \beta_{35}$  และ  $\beta_{45}$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างตัวแปร A, B, C, D และ E คือ ปัจจัยที่ศึกษา และ 1, 2, 3, 4 และ 5 คือ ลำดับของตัวแปร

## 3. การศึกษาความถูกต้องของการใช้สมการทำนายการผลิต ALA

นำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมจากข้อ 2.1 มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมตามที่ทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (5,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (ทดสอบ 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง) หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำหมักไปวิเคราะห์ปริมาณ ALA

## 4. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์

เก็บตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Eppendorf centrifuge 5810R, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณ ALA โดยวิธีการวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorometric method) โดยดัดแปลงวิธีการของ Lee *et al.* (2004) โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้ นำสารละลายส่วนใสและอาหารเลี้ยงเชื้อ (blank) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย acetylacetone ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร และสารละลาย formaldehyde เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany) ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำบรรจุน้ำแข็ง นำตัวอย่างไปวัดด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (PerkinElmer Fluorescence

Spectrometer LS 55, USA) โดยมีค่า emission wavelength (Em) 463 นาโนเมตร และค่า excitation wavelength (Ex) 370 นาโนเมตร และเปรียบเทียบปริมาณ ALA กับกราฟมาตรฐาน

### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

#### 1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ALA โดยแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 ด้วยวิธี RSM

ผลการศึกษาความเข้มข้นของกรดลิวูลินิก พีเอช ซักซิเนต ไกลซีน และอะซิเตทที่เหมาะสมต่อการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ในแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 โดยวิธี RSM และวางแผนการทดลองแบบ CCD แสดงดังตารางที่ 1 จำนวน 50 การทดลอง พบว่าการเพาะเลี้ยง *R. palustris* LBL15 ในอาหาร GAY ที่พีเอช 6.5 ร่วมกับการเติมกรดลิวูลินิก 15 มิลลิโมลาร์ ซักซิเนต 15 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน 10 มิลลิโมลาร์ และอะซิเตท 2.0 กรัมต่อลิตร เซลล์ผลิต ALA ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ  $43.82 \pm 0.87$  มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 43) (ตารางที่ 1) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหาร GAY ที่พีเอช 6.0 ร่วมกับการเติมกรดลิวูลินิก 20 มิลลิโมลาร์ ซักซิเนต 20 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน 7.5 มิลลิโมลาร์ และอะซิเตท 1.5 กรัมต่อลิตร เซลล์ผลิต ALA ได้เพียง  $8.64 \pm 0.18$  มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 6) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร GMY ที่พีเอช 6.5 และเติมกรดลิวูลินิก 10 มิลลิโมลาร์เพียงอย่างเดียว เซลล์ผลิต ALA ได้  $10.12 \pm 0.62$  มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเหล่านี้มีผลในการเพิ่มการผลิต ALA ใน *R. palustris* LBL15

**ตารางที่ 1** ผลของกรดลิวูลินิก พีเอช ซักซิเนต ไกลซีน และอะซิเตทที่เหมาะสมในการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ โดยแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15

ชุดการทดลอง	กรดลิวูลินิก (มิลลิโมลาร์) (A)	พีเอช (B)	ซักซิเนต (มิลลิโมลาร์) (C)	ไกลซีน (มิลลิโมลาร์) (D)	อะซิเตท (กรัมต่อลิตร) (E)	ปริมาณ ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
						ค่าจริง	ค่าทำนาย
1	10.0	6.0	10.0	7.5	1.5	$15.95 \pm 0.30$	13.98
2	20.0	6.0	10.0	7.5	1.5	$12.74 \pm 0.42$	13.31
3	10.0	7.0	10.0	7.5	1.5	$21.95 \pm 0.32$	21.82
4	20.0	7.0	10.0	7.5	1.5	$18.55 \pm 0.45$	19.78
5	10.0	6.0	20.0	7.5	1.5	$10.74 \pm 0.38$	13.18
6	20.0	6.0	20.0	7.5	1.5	$8.64 \pm 0.18$	8.07
7	10.0	7.0	20.0	7.5	1.5	$27.94 \pm 0.36$	26.79
8	20.0	7.0	20.0	7.5	1.5	$21.33 \pm 0.10$	20.32
9	10.0	6.0	10.0	12.5	1.5	$27.83 \pm 0.30$	26.92
10	20.0	6.0	10.0	12.5	1.5	$16.54 \pm 0.29$	16.70

**ตารางที่ 1** ผลของกรดลิวูลินิก พีเอช ซักซิเนต ไกลซีน และอะซิเตทที่เหมาะสมในการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ โดยแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 (ต่อ)

ชุดการทดลอง	กรดลิวูลินิก (มิลลิโมลาร์) (A)	พีเอช (B)	ซักซิเนต (มิลลิโมลาร์) (C)	ไกลซีน (มิลลิโมลาร์) (D)	อะซิเตท (กรัมต่อลิตร) (E)	ปริมาณ ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
						ค่าจริง	ค่าทำนาย
						11	10.0
12	20.0	7.0	10.0	12.5	1.5	17.95±0.45	16.75
13	10.0	6.0	20.0	12.5	1.5	26.53±0.20	26.14
14	20.0	6.0	20.0	12.5	1.5	10.44±0.25	11.48
15	10.0	7.0	20.0	12.5	1.5	33.84±0.25	33.33
16	20.0	7.0	20.0	12.5	1.5	15.93±0.26	17.31
17	10.0	6.0	10.0	7.5	2.5	18.53±0.28	16.98
18	20.0	6.0	10.0	7.5	2.5	14.83±0.71	15.09
19	10.0	7.0	10.0	7.5	2.5	20.36±0.68	19.11
20	20.0	7.0	10.0	7.5	2.5	17.83±0.39	15.86
21	10.0	6.0	20.0	7.5	2.5	20.22±0.70	18.64
22	20.0	6.0	20.0	7.5	2.5	12.92±0.36	12.32
23	10.0	7.0	20.0	7.5	2.5	26.53±0.45	26.55
24	20.0	7.0	20.0	7.5	2.5	18.55±0.90	18.86
25	10.0	6.0	10.0	12.5	2.5	27.64±0.45	28.22
26	20.0	6.0	10.0	12.5	2.5	17.75±0.60	16.78
27	10.0	7.0	10.0	12.5	2.5	25.53±0.47	23.93
28	20.0	7.0	10.0	12.5	2.5	11.82±0.50	11.12
29	10.0	6.0	20.0	12.5	2.5	30.74±0.44	29.90
30	20.0	6.0	20.0	12.5	2.5	14.73±0.35	14.03
31	10.0	7.0	20.0	12.5	2.5	32.75±0.75	31.39
32	20.0	7.0	20.0	12.5	2.5	13.96±0.55	14.15
33	5.0	6.5	15.0	10.0	2.0	18.94±0.27	22.13
34	25.0	6.5	15.0	10.0	2.0	4.42±0.51	4.22
35	15.0	5.5	15.0	10.0	2.0	10.84±0.44	11.85
36	15.0	7.5	15.0	10.0	2.0	17.83±0.62	19.81

**ตารางที่ 1** ผลของกรดลิวูลินิก พีเอช ซักซิเนต ไกลซีน และอะซิเตทที่เหมาะสมในการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ โดยแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 (ต่อ)

ชุดการทดลอง	กรดลิวูลินิก (มิลลิโมลาร์) (A)	พีเอช (B)	ซักซิเนต (มิลลิโมลาร์) (C)	ไกลซีน (มิลลิโมลาร์) (D)	อะซิเตท (กรัมต่อลิตร) (E)	ปริมาณ ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
						ค่าจริง	ค่าทำนาย
37	15.0	6.5	5.0	10.0	2.0	25.95±0.71	28.78
38	15.0	6.5	25.0	10.0	2.0	30.84±0.24	31.00
39	15.0	6.5	15.0	5.0	2.0	19.64±0.63	21.62
40	15.0	6.5	15.0	15.0	2.0	28.84±0.63	29.85
41	15.0	6.5	15.0	10.0	1.0	34.87±0.30	33.48
42	15.0	6.5	15.0	10.0	3.0	28.94±0.26	33.32
43	15.0	6.5	15.0	10.0	2.0	43.82±0.87	39.64
44	15.0	6.5	15.0	10.0	2.0	40.63±0.43	39.64
45	15.0	6.5	15.0	10.0	2.0	38.95±0.43	39.64
46	15.0	6.5	15.0	10.0	2.0	39.65±0.48	39.64
47	15.0	6.5	15.0	10.0	2.0	37.73±0.33	39.64
48	15.0	6.5	15.0	10.0	2.0	42.06±0.50	39.64
49	15.0	6.5	15.0	10.0	2.0	40.05±0.60	39.64
50	15.0	6.5	15.0	10.0	2.0	37.22±0.42	39.64

จากนั้นนำผลการทดลองในตารางที่ 1 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ซึ่งแสดงในตารางที่ 2 และ 3 และสามารถเขียนแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เป็นสมการถดถอยเพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ กรดลิวูลินิก พีเอช ซักซิเนต ไกลซีน และอะซิเตทกับค่าการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ใน *R. palustris* LBL15 แสดงดังสมการที่ 2

$$\begin{aligned}
 \text{ALA}_{(\text{mg/L})} = & 39.64 - 4.48A + 1.99B + 0.56C + 2.06D - 0.04E - 0.34AB - 1.11AC - 2.39AD - 0.30AE + 1.44BC \\
 & - 1.61BD - 1.43BE + 0.00625CD + 0.62CE - 0.43DE - 6.62A^2 - 5.95B^2 - 2.44C^2 - 3.48D^2 - 1.56E^2 \quad (2)
 \end{aligned}$$

เมื่อ  $\text{ALA}_{(\text{mg/L})}$  คือ ค่าการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) A คือ ความเข้มข้นของกรดลิวูลินิก (มิลลิโมลาร์) B คือ พีเอชของอาหาร C คือ ความเข้มข้นของซักซิเนต (มิลลิโมลาร์) D คือ ความเข้มข้นของไกลซีน (มิลลิโมลาร์) และ E คือ ความเข้มข้นของอะซิเตท (กรัมต่อลิตร)

การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) เพื่อตรวจสอบความเหมาะสม และคุณภาพของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จะใช้ค่าโมเดล (model) และค่าความสมรูป (lack of fit) ตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองตามสมการที่ 2 ส่วนคุณภาพของแบบจำลองจะตรวจสอบโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้ (adjusted  $R^2$ ) แสดงดังตารางที่ 2 การตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 2 พบว่าค่าโมเดลของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการผลิต ALA มีค่านัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) มีค่า  $P < 0.0001$  ซึ่งทำให้ทราบว่ากรดลิวูลินิก พีเอช ซักซิเนต ไกลซีน และอะซิเตทมีผลต่อการผลิต ALA ใน *R. palustris* LBL15 ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้ง 5 จะส่งผลต่อการผลิต ALA รวมทั้งยังแสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่พื้นผิวตอบสนองส่วนการตรวจสอบความสมรูป พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีความสมรูปกับข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมีค่า  $P$  เท่ากับ 0.6425 ( $P > 0.05$ ) แสดงว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากการทดลองเหมาะสมสำหรับใช้ทำนายค่าการผลิต ALA ในแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 ได้อย่างถูกต้อง

**ตารางที่ 2** การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของแบบจำลองสมการถดถอยของการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ในแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean Square	F-value	P-value
Model	20	4792.00	239.60	56.64	< 0.0001
Residual	29	122.68	4.23		
Lack of fit	22	89.34	4.06	0.85	0.6425
Pure error	7	33.34	4.76		
Corrected total	49	4914.68			

$R^2 = 0.9750$ , adjusted  $R^2 = 0.9578$

$R^2$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ และ adjusted  $R^2$  คือ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้

ส่วนคุณภาพของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิต ALA สามารถประเมินได้จากค่า  $R^2$  และ adjusted  $R^2$  แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าแบบจำลองมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9750 แสดงว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถเข้ากันได้กับข้อมูลที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองมีค่าเท่ากับ 97.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทั้ง 5 ปัจจัย เท่ากับ 97.50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 2.50 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลจากปัจจัยอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ในทำนองเดียวกัน adjusted  $R^2$  มีค่าเท่ากับ 0.9578 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงว่าแบบจำลองที่ได้มีความถูกต้องและเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทำนายการผลิต ALA ใน *R. palustris* LBL15 ดังนั้นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่มีค่า  $R^2$  และ adjusted  $R^2$  เข้าใกล้ 1 จะมีความแม่นยำในการทำนายค่าการผลิต ALA

ส่วนการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระทั้ง 5 นั้น เป็นการทดสอบว่าตัวแปรแต่ละตัว ได้แก่ กรดลิวูลินิก (A) พีเอช (B) ซักซิเนต (C) ไกลซีน (D) และอะซิเตท (E) ในแบบจำลองตามสมการที่ 2 มีอิทธิพลต่อค่าการผลิต ALA



หรือไม่ โดยพิจารณาในส่วนของพจน์เชิงเส้น (linear terms) พจน์ปฏิสัมพันธ์ร่วม (interaction terms) และพจน์กำลังสอง (square terms) แสดงดังตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยและค่าสถิติของการผลิต ALA ชนิดแห้งออกภายนอกเซลล์

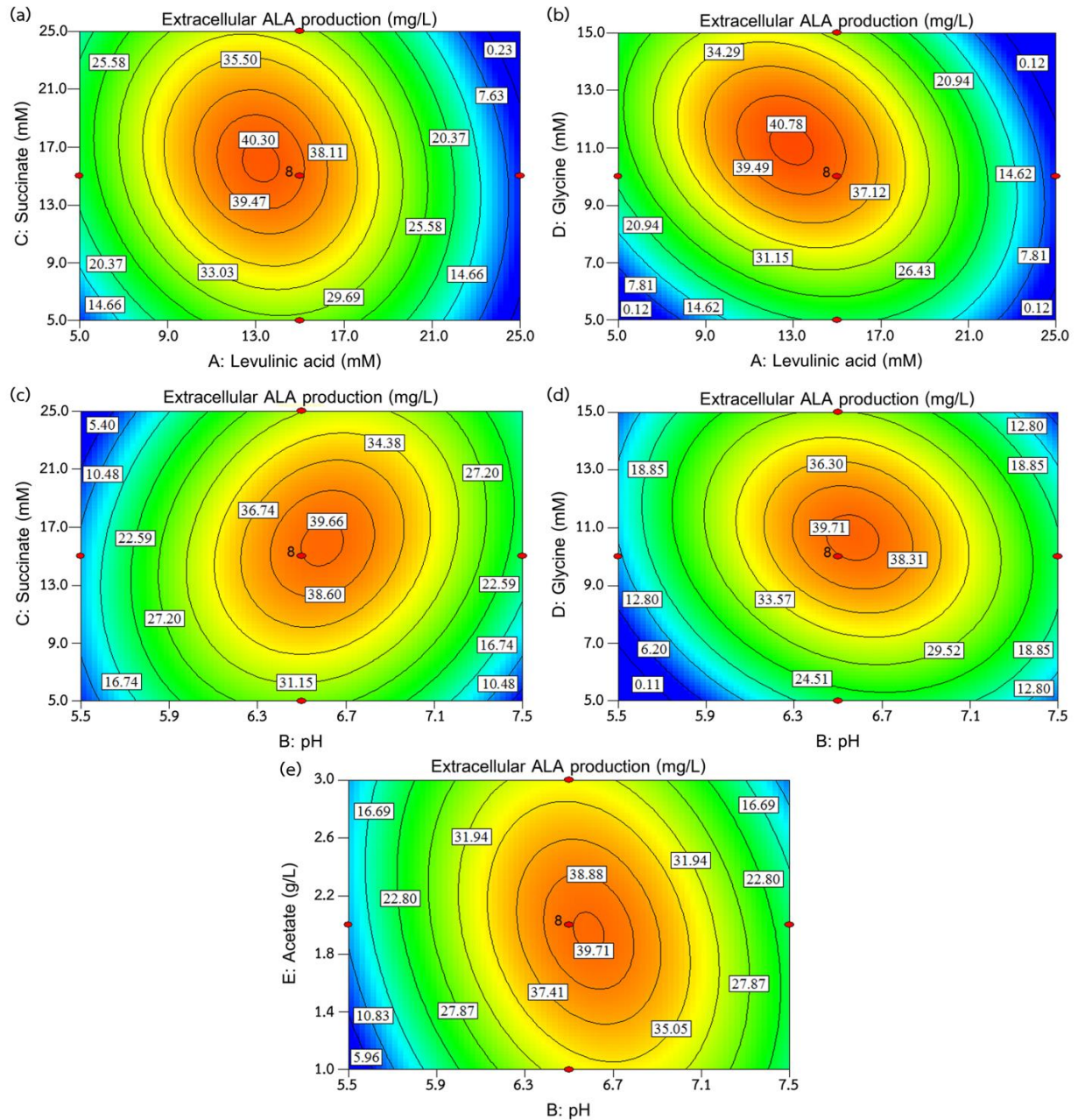
Variable	Coefficient estimate	Standard error	F-value	P-value
Intercept	39.64	0.71	56.64	< 0.0001
A-levulinic acid	-4.48	0.33	189.64	< 0.0001
B-pH	1.99	0.33	37.41	< 0.0001
C-succinate	0.56	0.33	2.92	0.0980
D-glycine	2.06	0.33	40.03	< 0.0001
E-acetate	-0.040	0.33	0.015	0.9030
AB	-0.34	0.36	0.88	0.3557
AC	-1.11	0.36	9.30	0.0049
AD	-2.39	0.36	43.16	< 0.0001
AE	-0.30	0.36	0.70	0.4103
BC	1.44	0.36	15.74	0.0004
BD	-1.61	0.36	19.49	0.0001
BE	-1.43	0.36	15.39	0.0005
CD	$6.25 \times 10^{-3}$	0.36	$2.95 \times 10^{-3}$	0.9864
CE	0.62	0.36	2.88	0.1002
DE	-0.43	0.36	1.37	0.2520
A <sup>2</sup>	-6.62	0.36	331.10	< 0.0001
B <sup>2</sup>	-5.95	0.36	267.99	< 0.0001
C <sup>2</sup>	-2.44	0.36	44.93	< 0.0001
D <sup>2</sup>	-3.48	0.36	91.39	< 0.0001
E <sup>2</sup>	-1.56	0.36	18.40	0.0002

เมื่อพิจารณาส่วนของพจน์เชิงเส้น พบว่าพจน์ A, B และ D เป็นตัวแปรอิสระที่มีผลต่อการผลิต ALA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) มีค่า  $P$ -value < 0.0001 ในทุกตัวแปรอิสระ เมื่อพิจารณาในส่วนของพจน์ปฏิสัมพันธ์ร่วม พบว่าพจน์ AC, AD, BC, BD และ BE มีผลต่อการผลิต ALA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) มีค่า  $P$  เท่ากับ 0.0049, < 0.0001, 0.0004, 0.0001 และ 0.0005 ตามลำดับ สุดท้ายเป็นการพิจารณาในส่วนของพจน์กำลังสอง จะเห็นได้ว่าค่า  $P$ -value ของพจน์ A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>,

$C^2$ ,  $D^2$  และ  $E^2$  มีค่าอยู่ในช่วง  $< 0.0001-0.0002$  (ตารางที่ 3) แสดงว่าตัวแปรอิสระในพจน์กำลังสองมีผลต่อการผลิต ALA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่ตัวแปรอิสระในพจน์อื่น ๆ มีค่า  $P > 0.05$  ส่งผลให้ตัวแปรอิสระในพจน์ดังกล่าวไม่มีอิทธิพลต่อแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับใช้ทำนายการผลิต ALA ใน *R. palustris* LBL15

จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 2 สามารถนำมาพล็อตกราฟโครงร่าง 2 มิติ (2-dimensional contour plots) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระต่าง ๆ กับการผลิต ALA ใน *R. palustris* LBL15 แสดงดังภาพที่ 1a-e พบว่ากราฟทุกกราฟมีลักษณะเป็นโครงร่าง 2 มิติแบบรูปวงรี (elliptical contour plots) การผลิต ALA สูงสุดจะอยู่ในพื้นที่วงรีขนาดเล็กที่สุด โดยลักษณะของกราฟที่ได้แสดงถึงการมีอิทธิพลร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ระหว่างตัวแปรอิสระต่าง ๆ ภาพที่ 1a แสดงปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างกรดลิวูลินิกและซัคซิเนต (AC) และภาพที่ 1b แสดงปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างกรดลิวูลินิกและไกลซีน (AD) โดยที่ตัวแปรอิสระตัวอื่นอยู่ในระดับกลาง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดลิวูลินิกจาก 5 เป็น 13 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 1a-b) ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซัคซิเนตและไกลซีนจาก 5 มิลลิโมลาร์ เป็น 15 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 1a) และ 11 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 1b) ตามลำดับ มีผลทำให้การผลิต ALA ใน *R. palustris* LBL15 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 40.78 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งกรดลิวูลินิก ซัคซิเนต และไกลซีนเป็นปัจจัยหลักที่มีผลในการเพิ่มการผลิต ALA ในแบคทีเรียและสาหร่าย (Liu *et al.*, 2014) กรดลิวูลินิกในรูปแบบที่ไม่แตกตัว (undissociated form) เป็นรูปแบบที่มีสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ ALAD ในวิถี  $C_4$  มีผลทำให้การผลิต ALA เพิ่มขึ้น (Sasaki *et al.*, 1987; Sasaki *et al.*, 1997) ในขณะที่ซัคซิเนตและไกลซีนจัดเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ ALA ในวิถี  $C_4$  โดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ succinyl-CoA synthase และ ALA synthase (ALAS) (Sasaki *et al.*, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sasaki *et al.* (1991); Chung *et al.* (2005); Tangprasittipap *et al.* (2007); Saikour *et al.* (2009); Choorit *et al.* (2011); Sattayasamitsathit & Prasertsan (2013) และ Liu *et al.* (2016) ที่รายงานว่าความเข้มข้นของกรดลิวูลินิก ซัคซิเนต และไกลซีนที่เหมาะสมต่อการผลิต ALA มีค่าอยู่ในช่วง 10-30, 8.56-30 และ 3-15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของกรดลิวูลินิกถึง 25 มิลลิโมลาร์ ซัคซิเนต 25 มิลลิโมลาร์ และไกลซีน 15 มิลลิโมลาร์ จะส่งผลให้ *R. palustris* LBL15 ผลิต ALA ลดลง (ภาพที่ 1a-b) เนื่องจาก (1) การเติมกรดลิวูลินิกในปริมาณสูงมีผลทำให้อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียมีพีเอชลดต่ำลง (พีเอชเป็นกรด) ส่งผลต่อการเจริญและการผลิต ALA ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Sattayasamitsathit & Prasertsan (2013) พบว่าการเติมกรดลิวูลินิก 12.5 มิลลิโมลาร์ จะส่งผลให้พีเอชของอาหารลดต่ำลง (pH 5.3) ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์และการสร้างคลอโรฟิลล์ใน *R. benzoatilyticus* รวมทั้งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALAS ทำให้การผลิต ALA ในวิถี  $C_4$  ลดลง (Noparatnaraporn *et al.*, 2000) (2) การเติมซัคซิเนตในปริมาณสูง (25 มิลลิโมลาร์) จะเกิดการยับยั้งโดยสารตั้งต้น (substrate inhibition) ทำให้การผลิต ALA ลดลง และ (3) การเพิ่มความเข้มข้นของไกลซีนถึง 15 มิลลิโมลาร์ จะส่งผลให้เกิดการสะสมแอมโมเนียภายในเซลล์เพิ่มขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของไกลซีน (Sasaki *et al.*, 2002) และยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ฟอริเฟริน รวมทั้งไกลซีนจัดเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ glutathione ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ซัลไฟดริลของเอนไซม์ ALAS ทำให้การทำงานของเอนไซม์ ALAS ลดลง (Neuberger, 1961) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chung *et al.* (2005) ได้ศึกษาผลของการเติมกรดลิวูลินิก ซัคซิเนต และไกลซีน พบว่าการผลิต ALA ใน recombinant *Escherichia coli* ที่ได้รับยีน *hemaA* (ยีนนำรหัสการสังเคราะห์เอนไซม์ ALAS) จาก *Bradyrhizobium japonicum* จะลดลง เมื่อเติมกรดลิวูลินิกที่ความเข้มข้น 40-60 มิลลิโมลาร์ ซัคซิเนต

45-90 มิลลิโมลาร์ และไกลซีน 20-30 มิลลิโมลาร์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์แบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิต ALA



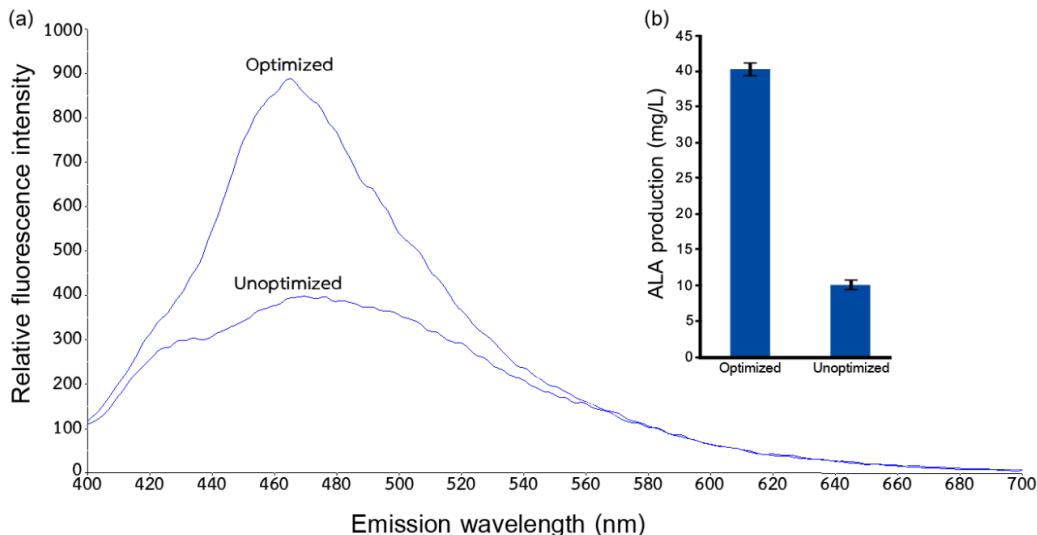
**ภาพที่ 1** กราฟโครงร่างการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ในแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GAY ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (5,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โดยที่ (a) ปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างกรดลิวลินิกและซัคซิเนต (b) กรดลิวลินิกและไกลซีน (c) ฟีเอชและซัคซิเนต (d) ฟีเอชและไกลซีน และ (e) ฟีเอชและอะซิเตท ส่วนปัจจัยอื่น ๆ อยู่ในระดับกลาง

ภาพที่ 1c แสดงปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างพีเอชและซัคซิเนต (BC) ภาพที่ 1d แสดงปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างพีเอชและไกลซีน (BD) และภาพที่ 1e ปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างพีเอชและอะซิเตท (BE) โดยที่ตัวแปรอิสระตัวอื่นอยู่ในระดับกลางพบว่าแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 ผลิต ALA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อพีเอช ซัคซิเนต ไกลซีน และอะซิเตทมีค่าเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 39.71 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อมีพีเอช 6.6 (รูปที่ 1c-e) ซัคซิเนต 15 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 1c) ไกลซีน 11 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 1d) และอะซิเตท 2 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 1e) ซึ่งพีเอชของอาหารเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิต ALA เนื่องจาก (1) พีเอชมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ALAS และ ALAD ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ALA ในวิถี  $C_4$  (Liu *et al.*, 2005; Heinemann *et al.*, 2008) โดยพบว่าเอนไซม์ ALAS และ ALAD จะถูกยับยั้งเมื่อพีเอชมีค่า 6.0-6.5 ในขณะที่พีเอช 6.8-7.0 จะมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ALAS ให้สูงขึ้น แต่การทำงานของเอนไซม์ ALAD จะถูกยับยั้ง ส่วนที่พีเอช 8.0 พบว่ามีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ ALAD แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยง *R. palustris* LBL15 มีการผลิต ALA สูงสุดที่พีเอช 6.6 และจะลดลงเมื่อพีเอช 7.5 ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Liu *et al.* (2015) และ Sattayasamitsathit & Prasertsan (2014) ที่รายงานว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิต ALA ของ *R. sphaeroides* และ *R. benzoatilyticus* มีค่าเท่ากับ 7.0 และการผลิต ALA จะลดลงเมื่อพีเอชมีค่า 5.0-6.0 (2) พีเอชมีผลต่อการแตกตัวของกรดลิวลินิก โดยกรดลิวลินิกในรูปที่ไม่แตกตัวจะยับยั้งเอนไซม์ ALAD ได้ดีที่สุด (Noparatnarapom *et al.*, 2000) ทั้งนี้การแตกตัวจะขึ้นอยู่กับพีเอชของอาหาร การเติมกรดลิวลินิก 15 มิลลิโมลาร์ที่พีเอช 7.5 จะยับยั้งเอนไซม์ ALAD ได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พีเอช 6.5 สามารถยับยั้งเอนไซม์ ALAD ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และจะยับยั้งเอนไซม์ ALAD ได้มากที่สุด (80 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5 ร่วมกับการเติมกรดลิวลินิก 5 มิลลิโมลาร์ (Sasaki *et al.*, 1997) และ (3) พีเอชมีผลต่อการแตกตัวและการใช้สารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น ซัคซิเนต ไกลซีน และอะซิเตท โดยที่ซัคซิเนตและไกลซีนเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ ALA โดยตรงผ่านวิถี  $C_4$  ในขณะที่อะซิเตทจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิต ALA (Choorit *et al.*, 2011) ดังนั้นการใช้สารอินทรีย์เหล่านี้จึงมีผลต่อการผลิต ALA ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพีเอชของอาหาร จากรายงานการวิจัยของ Sattayasamitsathit & Prasertsan (2014) พบว่าที่พีเอช 7.0 แบคทีเรีย *R. benzoatilyticus* ใช้กรดลิวลินิกและอะซิเตทมากที่สุด 45.40 และ 17.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่พีเอช 6.5 ซัคซิเนตถูกใช้สูงสุด 31.71 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การผลิต ALA เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 212-286 ไมโครโมลาร์ ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยง *R. palustris* LBL15 ในอาหาร GAY ที่พีเอช 6.6 เซลล์ผลิต ALA ได้สูงสุด (ภาพที่ 1c-e) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5 หรือ 7.5 ร่วมกับการเติมซัคซิเนต 25 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน 15 มิลลิโมลาร์ และอะซิเตท 3 กรัมต่อลิตร การผลิต ALA ใน *R. palustris* LBL15 จะลดลง (ภาพที่ 1c-e) เนื่องจากที่พีเอชเป็นต่าง (pH 7.5) หรือพีเอชเป็นกรด (pH 5.5) ซัคซิเนต ไกลซีน และอะซิเตทจะอยู่ในรูปที่แตกตัวและไม่แตกตัว โดยรูปที่ไม่แตกตัวจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ ทำให้ภายในเซลล์มีพีเอชเป็นกรด (Luli & Strohl, 1990) ส่งผลให้เซลล์ต้องใช้พลังงาน (adenosine triphosphate, ATP) ในการปรับสมดุลของพีเอชภายในเซลล์ให้อยู่ในระดับพีเอชปกติ (pH 7.5) แทนที่จะใช้พลังงานในการเจริญและกระบวนการสังเคราะห์สาร (Zeng *et al.*, 1990) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายในเซลล์จะส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถออกซิไดซ์แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้ ส่วนในรูปที่แตกตัวจะมีการปลดปล่อย  $H^+$  ออกมา ทำให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างประจุภายในและภายนอกเซลล์ เซลล์ต้องใช้พลังงาน ATP ในการแลกเปลี่ยนประจุเพื่อรักษาความสมดุลของเซลล์ อาจส่งผลให้การผลิต ALA ใน *R. palustris* LBL15 ลดลง (ภาพที่ 1c-e)

## 2. ผลการศึกษาความถูกต้องของการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทำนายการผลิต ALA

จากผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ใน *R. palustris* LBL15 ประกอบด้วยกรดลิวลินิก 12.81 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.58 ซักซิเนต 16.28 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน 11.03 มิลลิโมลาร์ และอะซิเตท 1.98 กรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองจริงและค่าที่ได้จากการทำนาย แสดงดังภาพที่ 2a-b พบว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว (optimized) มีความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงกว่าในสภาวะที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุง (unoptimized) (ภาพที่ 2a) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ได้รับการปรับปรุงเซลล์ *R. palustris* LBL15 ผลิต ALA ได้สูงกว่าสภาวะที่ยังไม่ได้รับการปรับปรุง และเมื่อสแกนค่า Em ด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (โดยกำหนดค่า Ex เท่ากับ 370 นาโนเมตร) มีค่าเท่ากับ 463 นาโนเมตร ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่า *R. palustris* LBL15 สามารถผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ได้จริง เนื่องจากเทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์มีความจำเพาะสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al.* (2004) และ Oishi *et al.* (1996) ที่รายงานว่าสารประกอบฟลูออเรสเซนซ์ของอนุพันธ์ ALA คือ 2,6-diacetyl-1,5-dimethyl-7-(2-carboxyethyl)-3H-pyrrolizing มีค่า Em และ Ex เท่ากับ 463 และ 370 นาโนเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำค่าความเข้มขึ้นของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เปรียบเทียบกับกราฟ ALA มาตรฐาน พบว่า *R. palustris* LBL15 ผลิต ALA ได้เท่ากับ  $40.32 \pm 0.43$  มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 2 คือ  $41.28$  มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบการผลิต ALA ก่อนและหลังการปรับปรุงสภาวะของการเพาะเลี้ยง พบว่าผลิต ALA ได้เพิ่มขึ้น 4 เท่า (ภาพที่ 2b) และเมื่อพิจารณาที่ค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด (% error) พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.33 ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดที่ยอมรับได้ไม่ควรเกิน 5 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากแบบจำลองมีความน่าเชื่อถือ และสามารถนำไปใช้ทำนายค่าการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ได้อย่างถูกต้อง และพบว่ามีค่าการผลิต ALA ( $40.32 \pm 0.43$  มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ  $240.59 \pm 2.57$  ไมโครโมลาร์) สูงกว่างานวิจัยของ Saikur *et al.* (2009) ได้เพาะเลี้ยง *R. palustris* KG31 ในอาหารเหลวสูตร VFA ร่วมกับการเติมไกลซีน 30 มิลลิโมลาร์ และกรดลิวลินิก 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะนิ่ง-มีแสง (static-light condition) (5,500 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 54 ชั่วโมง ผลิต ALA ได้เท่ากับ 182.91 ไมโครโมลาร์ และผลิต ALA ได้ 190.74 ไมโครโมลาร์ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *R. benzoatilyticus* ในอาหาร glutamate-malate (GM) ร่วมกับการเติมไกลซีน 7.5 มิลลิโมลาร์ ซักซิเนต 10 มิลลิโมลาร์ และกรดลิวลินิก 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง (3,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (Sattayasamitsathit & Prasertsan, 2013)





**ภาพที่ 2** การเปรียบเทียบความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของอนุพันธ์ ALA (a) และการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์โดยแบคทีเรีย *R. palustris* LBL15 (b) เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย-มีแสง(5,000 ลักซ์) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โดยที่ unoptimized เป็นการเพาะเลี้ยงในอาหาร GMY ร่วมกับการเติมกรดลิวลินิก 10 มิลลิโมลาร์ และ optimized คือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร GAY ที่ประกอบด้วยกรดลิวลินิก 12.81 มิลลิโมลาร์ ฟิเชซ 6.58 ซักซิเน็ต 16.28 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน 11.03 มิลลิโมลาร์ และอะซิเตท 1.98 กรัมต่อลิตร

### สรุปผลการวิจัย

จากการประยุกต์ใช้วิธี RSM และออกแบบการทดลองแบบ CCD เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ALA ชนิดหลังออกภายนอกเซลล์ พบว่าการลดลิวลินิก ฟิเชซ และไกลซีนเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต ALA ใน *R. palustris* LBL15 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่ซักซิเน็ตและอะซิเตทไม่มีผลต่อการเพิ่มการผลิต ALA โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต ALA คือ การเติมกรดลิวลินิก 12.81 มิลลิโมลาร์ ฟิเชซ 6.58 ซักซิเน็ต 16.28 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน 11.03 มิลลิโมลาร์ และอะซิเตท 1.98 กรัมต่อลิตร ผลิต ALA ได้เท่ากับ  $40.32 \pm 0.43$  มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าการผลิต ALA ที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 2 คือ 41.28 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการปรับปรุงสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงแล้วสามารถเพิ่มการผลิต ALA ได้ถึง 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลองจริงกับค่าที่ได้จากการทำนาย พบว่ามีค่าความผิดพลาดของการผลิต ALA เท่ากับ 2.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความเข้มข้นของ ALA ที่ผลิตโดย *R. palustris* LBL15 สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้

### กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ประจำปีงบประมาณ 2558 ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยาที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับการดำเนินการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- Akram, N.A., & Ashraf, M. (2013). Regulation in plant stress tolerance by a potential plant growth regulator, 5-aminolevulinic acid. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(3), 663-679.
- An, J.S, Kim, J.E., Lee, D.H., Kim, B.Y., Cho, S., Kwon, I.H., Choi, W.W., Kang, S.M., Won, C.H., Chang, S.E., Lee, M.W., Choi, J.H., & Moon, K.C. (2011). 0.5% Liposome-encapsulated 5-aminolevulinic acid (ALA) photodynamic therapy for acne treatment. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 13, 28-32.
- Bragagni, M., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., & Mura, P. (2015). Development and *ex vivo* evaluation of 5-aminolevulinic acid-loaded niosomal formulations for topical photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(1), 258-263.
- Chakraborty, N., & Tripathy, B.C. (1992). Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid induced photodynamic damage of cucumber chloroplast. *Plant Physiology*, 98(1), 7-11.
- Choorit, W., Saikeur, A., Chodok, P., Prasertsan, P., & Kantachote, D. (2011). Production of biomass and extracellular 5-aminolevulinic acid by *Rhodospseudomonas palustris* KG31 under light and dark conditions using volatile fatty acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(6), 658-664.
- Chung, S.Y., Seo, K.H., & Rhee, J.I. (2005). Influence of culture conditions on the production of extracellular 5-aminolevulinic acid (ALA) by recombinant *E. coli*. *Process Biochemistry*, 40(1), 385-394.
- Feng, S., Li, M.F., Wu, F., Li, W.L., & Li, S.P. (2015). 5-Aminolevulinic acid affects fruit coloration, growth, and nutrition quality of *Litchi chinensis* Sonn. cv. Feizixiao in Hainan, tropical China. *Scientia Horticulturae*, 193, 188-194.
- Grigalavicius, M., Juraleviciute, M., Kwitniewski, M., & Juzeniene, A. (2017). The influence of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on senescent skin cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 17, 29-34.
- Heinemann, I.U., Jahn, M., & Jahn, D. (2008). The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474(2), 238-251.
- Kantha, T., Chaiyasut, C., Kantachote, D., Sukrong, S., & Muangprom, A. (2010). Selection of photosynthetic bacteria producing 5-aminolevulinic acid from soil of organic saline paddy fields from the Northeast region of Thailand. *African Journal of Microbiology Research*, 4(17), 1848-1855.
- Kars, G., & Alparslan, U. (2013). Valorization of sugar beet molasses for the production of biohydrogen and 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a biorefinery concept. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(34), 14488-14494.
- Lee, C., Qiao, X., Goeger, D.E., & Anderson, K.E. (2004). Fluorometric measurement of 5-aminolevulinic acid in serum. *Clinica Chimica Acta*, 347(1-2), 183-188.

- Liu, S., Li, X., Zhang, G., & Zhang, J. (2015). Optimization of influencing factors on biomass accumulation and 5-aminolevulinic acid (ALA) yield in *Rhodobacter sphaeroides* wastewater treatment. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1920-1927.
- Liu, X.Y., Xu, X.Y., Ma, Q.L., & Wu, W.H. (2005). Biological formation of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *Journal of Environmental Sciences-China*, 17(1), 152-155.
- Liu, S., Zhang, G., Li, J., Li, X., & Zhang, J. (2016). Optimization of biomass and 5-aminolevulinic acid production by *Rhodobacter sphaeroides* ATCC17023 via response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(3), 444-458.
- Liu, S., Zhang, G., Li, X., & Zhang, J. (2014). Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7349-7357.
- Luli, G.W., & Strohl, W.R. (1990). Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), 1004-1011.
- Neuberger, A. (1961). Aspects of the metabolism of glycine and porphyrins. *Biochemistry Journal*, 78, 1-10.
- Noparatnaraporn, N., Watanabe, M., & Sasaki, K. (2000). Extracellular formation of 5-aminolevulinic acid by intact cells of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. under various pH conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 313-315.
- Oishi, H., Nomiyama, H., Nomiyama, K., & Tomokuni, K. (1996). Fluorometric HPLC determination of delta-aminolevulinic acid (ALA) in the plasma and urine of lead workers: biological indicators of lead exposure. *Journal of Analytical Toxicology*, 20(2), 107-110.
- Qin, G., Lin, J., Liu, X., & Cen, P. (2006). Effects of medium composition on production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(4), 316-322.
- Saikeur, A., Choorit, W., Prasertsan, P., Kantachote, D., & Sasaki, K. (2009). Influence of precursors and Inhibitor on the production of extracellular 5-aminolevulinic acid and biomass by *Rhodopseudomonas palustris* KG31. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(5), 987-992.
- Sasaki, K., Ikeda, S., Nishizawa, Y., & Hayashi, M. (1987). Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *Journal of Fermentation Technology*, 65(5), 511-515.
- Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y., & Hayashi, M. (1991). Enhanced production of 5-aminolevulinic acid by repeated addition of levulinic acid and supplement of precursors in photoheterotrophic culture of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(6), 403-406.



- Sasaki, K., Watanabe, M., & Nishio, N. (1997). Inhibition of 5-aminolevulinic acid (ALA) dehydratase by undissociated levulinic acid during ALA extracellular formation by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnology Letters*, 19(5), 421-424.
- Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., & Tanaka, T. (2002). Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(1), 23-29.
- Sasikala, C., Ramana, C.V., & Rao, P.R. (1994). 5-Aminolevulinic acid: a potential herbicide/insecticide from microorganisms. *Biotechnology Progress*, 10(5), 451-459.
- Sattayasamitsathit, S., & Prasertsan, P. (2013). Characterization of a newly isolated *Rubrivivax benzoatilyticus* PS-5 with self-flocculation property and optimization pathway for 5-aminolevulinic acid production. *African Journal of Biotechnology*, 12(16), 2069-2081.
- Sattayasamitsathit, S., & Prasertsan, P. (2014). Improvement of 5-aminolevulinic acid production by *Rubrivivax benzoatilyticus* PS-5 with self-flocculation by co-fermentation of precursors and volatile fatty acids under pH-controlled conditions. *Annals of Microbiology*, 64(1), 385-389.
- Sonhom, R., Thepsithar C., & Jongsareejit, B. (2012). High level production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* grown in a low-cost medium. *Biotechnology Letters*, 34(9), 1667-1672.
- Tangprasittipap, A., Prasertsan, P., Choorit, W., & Sasaki, K. (2007). Biosynthesis of intracellular 5-aminolevulinic acid by a newly identified halotolerant *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnology Letters*, 29(5), 773-778.
- Xie, L., Wang, Z.H., Cheng, X.H., Gao, J.J., Zhang, Z.P., & Wang, L.J. (2013). 5-Aminolevulinic acid promotes anthocyanin accumulation in Fuji apples. *Journal of Plant Growth Regulation*, 69(3), 295-303.
- Ye, J., Yang, X., Chen, Q., Xu, F., & Wang, G. (2017). Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on fruit quality and coloration of *Prunus persica* (L.) Batsch. *Scientia Horticulturae*, 217, 266-275.
- Zeng, A.P., Biebl, H., & Deckwer, W.D. (1990). Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 485-489.