บทที่ 1

บทนำ

1.1 ไซเดอโรฟอร์ (Siderophore)

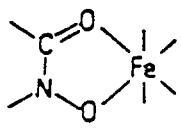
ธาตุเหล็ก (Fe) เป็นหนึ่งในโลหะทรานสิชันของแถวแรก มีการจัดเรียงตัวของอิเล็กตรอนเป็นแบบ $3d^6, 4s^2$ เหล็กมีสภาพออกซิเดชัน (Oxidation state) เปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง -2 ถึง +6 แต่ oxidation state ที่มีค่า +2 และ +3 เท่านั้นที่มีบทบาทสำคัญและจำเป็นต่อระบบชีวภาพ เนื่องจากธาตุเหล็กเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ และมีความจำเป็นต่อกระบวนการทางชีวภาพของจุลชีพต่าง ๆ ค่า Oxidation state ของเหล็กที่อยู่ในรูปของไอออนเฟอร์รัส (ferrous ion, Fe^{2+}) และไอออนเฟอร์ริก (ferric ion, Fe^{3+}) ยังเป็นตัวช่วยเสริมให้ธาตุเหล็กมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาการถ่ายเทอิเล็กตรอน ภายใต้สภาวะทางกายภาพไอออนของเหล็กโดยเฉพาะไอออนเฟอร์ริกไม่สามารถละลายออกมาได้ ณ ค่าความเป็นกรด-เบสที่เป็นกลางในตัวกลาง ส่วนใหญ่เหล็กที่ไม่ละลายนั้นจะอยู่ในรูปสารเชิงซ้อนโพลินิวเคลียร์เฟอร์ริกอ็อกซิโรดไฮดรอกไซด์ [Polynuclear ferricoxidohydroxide, $Fe(OH)_3$] ซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนที่มีความสามารถในการละลายเพียง 10^{-38} ถือว่ามีค่าน้อยมากต่อการละลายของเหล็ก ในขณะที่ค่าความสามารถในการละลายของไอออนของเหล็กสูงมากถึง 10^{-17} โมลาร์ ดังนั้นเมื่อเกิดสภาวะดังกล่าวข้างต้น จุลชีพจึงมีความจำเป็นต้องมีกลไกบางอย่างภายในเซลล์ ในการที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพของเหล็ก ให้เกิดการละลายมากขึ้นต่อการนำไปใช้ ฉะนั้นจุลชีพมากมายจึงพยายามที่จะพัฒนากลไกเฉพาะขึ้นมาเพื่อตอบสนองความต้องการต่อการดำรงชีวิตในการนำเหล็กมาใช้ โดยจุลชีพจะปลดปล่อยสารที่เป็นคีเลตติ้ง (Chelating agent) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (500-1500 ดาลตัน) และมีความสามารถในการจับเหล็กได้ดี ออกไปสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก สารตัวนี้มีชื่อเรียกในปัจจุบันว่าไซเดอโรฟอร์ (Siderophores) โดยมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก ที่แปลว่า ตัวจับเหล็ก (iron bearers)

1.1.1 โครงสร้างและลักษณะทางเคมีของไซเดอโรฟอร์

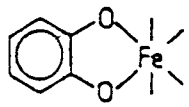
ไซเดอโรฟอร์ มีโครงสร้างทางเคมีค่อนข้างสลับซับซ้อนและมีหลายรูปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของจุลชีพ ซึ่งสามารถจำแนกไซเดอโรฟอร์ได้ดังนี้

1. Hydroxamate หรือ thiohydroxamate และ
2. Catecholate หรือ phenol
3. อนุพันธ์ของ carboxylic acid ที่จับกับอนุพันธ์ของออกซิเจนหรือไนโตรเจนตรงตำแหน่งโคออดิเนชันที่สอง (second coordination)

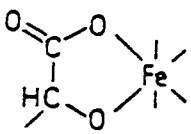
โครงสร้างและลักษณะทางเคมีของไซเดอโรฟอร์แสดงในรูปที่ 1.1 และ 1.2



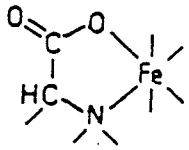
Hydroxamate



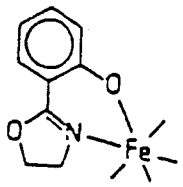
Catecholate



α-Hydroxycarboxylate



α-Aminocarboxylate



2-(O-Hydroxyphenyl) oxazaline

รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างฟังก์ชันนัล กรุ๊ป ของสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์

1.1.2 วิธีการต่าง ๆ ในการศึกษาและวิเคราะห์หาโครงสร้างของไซเดอโรฟอร์

ดังได้กล่าวมาแล้วว่า ไซเดอโรฟอร์มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน และมีลักษณะที่แตกต่างกันขึ้นกับสภาพแวดล้อม และชนิดของจุลชีพ โครงสร้างของไซเดอโรฟอร์ที่อยู่ในรูปอิสระ และสารเชิงซ้อน ปัจจุบันมีวิธีการศึกษาโครงสร้างได้หลายวิธีด้วยเครื่องมือต่าง ๆ เช่น เครื่อง nuclear magnetic resonance spectrometer ที่รู้จักกันในนามว่าเครื่อง NMR spectrometer ซึ่งจำเป็นต้องวิเคราะห์ไซเดอโรฟอร์ในรูปลิแกนด์อิสระ ส่วนเครื่อง Fast atom bombard-mass spectrometer (FAB-mass spectrometer) นั้น ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไซเดอโรฟอร์ทั้งในรูปอิสระและสารเชิงซ้อนได้ นอกจากนั้นยังสามารถหาการจัดเรียงตัวของกลุ่มกรดอะมิโนที่อยู่ภายในโครงสร้างได้ด้วย สำหรับวิธี x-ray diffractometry สามารถวิเคราะห์ผลึกของสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ได้เช่นเดียวกัน ตัวอย่างคือ pseudobactin B10 นอกเหนือจากนี้ได้มีการใช้เทคนิค paper electrophoresis ที่วิเคราะห์ได้ทั้งในรูปอิสระและสารเชิงซ้อน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาขึ้นอยู่กับชนิดของประจุ ขนาดของไซเดอโรฟอร์ และชนิดของโมเลกุลไซเดอโรฟอร์เป็นต้น

1.1.3 ความสำคัญของไซเดอโรฟอร์

เนื่องจากไซเดอโรฟอร์มีความสามารถและมีสมบัติในการจับโลหะ โดยเฉพาะธาตุเหล็กได้ดี ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์หลายสาขาจึงได้นำสมบัตินี้มาใช้ให้เป็นประโยชน์ อย่างเช่นด้านการแพทย์ กรณีที่ผู้ป่วยมีธาตุเหล็กในร่างกายมากเกินไป (ในส่วนของฮีโมโกลบิน) โดยเฉพาะโรค β-thalassaemia ปัจจุบันทำการรักษาโดยฉีดยาชนิดหนึ่งชื่อว่า Desferal ซึ่งเป็น trihydroxamate siderophore derferrioxamine-B แทนการถ่ายเลือดในสมัยก่อน ๆ Desferal เป็นชื่อทางการค้าของบริษัท Ciba-Geigy จำกัด และยังมีประโยชน์ต่อทางเกษตรกรรมโดยการผสม Rhizobacteria ชื่อว่า *Pseudomonas putida* ลงในดินจะเป็นผลที่ทำให้มีการปล่อยไซเดอโรฟอร์ชนิดหนึ่งออกมา ซึ่งเรียกว่า Pseudobactin ที่มีส่วนเร่งและสร้างความเจริญเติบโตให้แก่พืช นอกจากนั้นยังช่วยเพิ่มผลผลิตให้ได้มากยิ่งขึ้น แบคทีเรียชนิดนี้ปกติอาศัยอยู่รวมกันที่รากของพืชบางชนิด เช่น มะเขือเทศ

หัวน้ำตาล (beat root) หรือผักกาด แล้วแบคทีเรียชนิดนี้ยังมีความสามารถในการแย่งเหล็กได้ดีกว่าเชื้อราและแบคทีเรียอื่น ๆ ที่เป็นอันตรายต่อพืช โดยช่วยส่งเสริมให้รากพืชดึงเหล็กไปใช้ได้มากขึ้น จากการที่ Rhizobacteria นั้นปลดปล่อย Pseudobactin ออกมา กลุ่มแบคทีเรียในดินบางชนิดสามารถปลดปล่อย Catecholates siderphore ที่ละลายน้ำได้ ภายใต้สภาวะที่มีเหล็กปริมาณน้อย ๆ และยังมีบทบาทสำคัญต่อการอนุรักษ์ประชากรของจุลชีพต่าง ๆ ในดินเพื่อให้เกิดความสมดุล ทางธรรมชาติอีกด้วย

1.2 เจลโครมาโทกราฟี (Gel chromatography)

เจลโครมาโทกราฟีเรียกชื่อเป็นอย่างอื่นได้หลายชื่อ เช่น gel filtration, molecular sieve filtration, exclusion chromatography และ gel permeation chromatography วิธีการแยกสารขั้นพื้นฐานจะใช้คอลัมน์ ที่บรรจุด้วยตัวกลางแยกสารที่มีลักษณะรูพรุน (packing material) คอลัมน์ที่ใช้มีหลายขนาด ตัวทำละลายจะไหลผ่านคอลัมน์อย่างต่อเนื่อง เมื่อบรรจุสารที่ต้องการแยกจำนวนเล็กน้อยลงในส่วนบนของคอลัมน์ ต่อจากนั้นปั๊มตัวทำละลายผ่านคอลัมน์เจลโครมาโทกราฟี ลักษณะการแยกภายในคอลัมน์เป็นความสัมพันธ์ระหว่าง ขนาดของโมเลกุล กับปริมาตรการชะ และค่าการแจกแจงคงที่ (distribution constant, K_d) ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างขนาดเล็ก สามารถเข้าไปอยู่ในรูพรุนได้อย่างอิสระจะมีค่า $K_d = 1$ ในขณะที่โมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนได้เลยค่า $K_d = 0$ โมเลกุลขนาดกลางจะมีค่า K_d อยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ดังนั้น โมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก

1.3 โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง เป็นเทคนิคการแยกสารซึ่งอาศัยสมบัติการกระจายที่แตกต่างกันของตัวละลายระหว่างเฟส 2 เฟส เฟสแรกเรียกว่าเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) เป็นของเหลวที่เคลือบบาง ๆ บนของแข็งหรือเป็นของแข็งผงละเอียด เฟสที่สองเรียกว่าเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น

ของเหลวมีการเคลื่อนที่อย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอ ที่จุดต่าง ๆ ตามความยาวของคอลัมน์ จะเกิดสมดุลระหว่างเฟสอย่างรวดเร็ว หลักการทำงาน เฟสเคลื่อนที่ถูกปั๊มจากภาชนะใส่สาร (reservoir) ผ่านที่ฉีดสาร (injection port) เพื่อจะพาสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านไปยังคอลัมน์ (column) จากนั้น จะเกิดการแยกกันขององค์ประกอบของสารผ่านเข้าสู่เซลล์วัดด้วยเครื่องวัดสัญญาณ (detector) และถูกบันทึกออกมาโดยเครื่องบันทึก (recorder)

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารเชิงซ้อนเหล็ก -ไซเดอโรฟอร์ โดยสกัดไซเดอร์โรฟอร์จากแบคทีเรีย ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้อยู่ในรูปของสารเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอร์โรฟอร์ สารเชิงซ้อนที่สกัดได้นำไปทำการแยกให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคเจลโครมาโทกราฟี (Gel Chromatography) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารเชิงซ้อนที่แยกได้ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป