



รายงานวิจัย

การผลิตเอนไซม์ตรึงรูปที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อน
กลุ่มเอไมด์และไนไตรล์

Construction of an immobilized enzyme with the potential
for amide/nitrile degradation

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย งบประมาณเงินแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ 2557

กิติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตเอนไซม์ตรึงรูปที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อนกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์” สำเร็จลงด้วยดีเนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 จากงบประมาณเงินแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

พฤศจิกายน 2558

บทคัดย่อ

ความสนใจในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สืบเนื่องมาจากการปนเปื้อนของสารเคมีเป็นสิ่งที่กำลังได้รับความนิยมนำไปใช้ในการค้นหากระบวนการควบคุมแบบยั่งยืนที่ไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม การสลายทางชีวภาพเป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้ในการกำจัดสารอินทรีย์ปนเปื้อนที่ไม่พึงประสงค์ให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ไม่สามารถตรวจสอบได้หรือต่ำกว่าค่าอันตรายที่กำหนด แต่ก็ยังมีหลักที่จะต้องพิจารณาคือศักยภาพในการสลายและการค้นหาสิ่งมีชีวิตที่มีประสิทธิภาพที่จะนำมาใช้ในการสลายได้

อะคริลาไมด์เป็นสารเคมีในรูปผลึกของแข็งที่ไม่มีสีไม่มีกลิ่นที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมและมีการผลิตต่อปีสูงถึงประมาณสองแสนตัน จากการใช้กันอย่างแพร่หลายนำมาสู่การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มาจากสองช่องทางหลักคือ จากผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านการปรุงแต่งที่อุณหภูมิสูงกว่า 120 องศาเซลเซียส และเป็นของเสียตกค้างในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเคยพบรายงานการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ในสิ่งแวดล้อมสูงถึง 200-500 ppm และเนื่องจากมีรายงานยืนยันว่าอะคริลาไมด์เป็นสารพิษที่ส่งผลต่อระบบประสาทและมีแนวโน้มสูงที่จะเป็นสารก่อมะเร็งในคน การสลายทางชีวภาพของสารอะคริลาไมด์เป็นสารที่มีอันตรายน้อยลงจึงเป็นสิ่งที่กำลังพิจารณามาใช้ในการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากสารชนิดนี้

จากข้อเท็จจริงที่ว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทะเลมีลักษณะพิเศษในการเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อการดำรงชีวิตและเจริญในสภาวะสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง และเคยมีรายงานถึงการใช้อนุพันธ์หลายชนิดโดยจุลินทรีย์ในทะเล แต่ทั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานถึงการสลายสารพิษจากจุลินทรีย์ในทะเล ในโครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ค้นพบ *Bacillus cereus* ซึ่งแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ชนิดใหม่ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลจากเกาะจานแสมสาร ที่ระดับความลึก 18 เมตร แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสภาวะที่มีค่าพีเอชช่วงกว้าง ระหว่าง 6.0-9.0 และอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส โดยสามารถตรวจพบการสลายของอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิกภายหลังการเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และตรวจพบการสลายสูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจของแบคทีเรียได้ทะเลที่จะเป็นแหล่งผลิตสิ่งมีชีวิตที่สามารถสลายอะคริลาไมด์แหล่งใหม่ได้

คำสำคัญ อะคริลาไมด์, การสลายทางชีวภาพ, แบคทีเรียใต้ทะเล, *Bacillus cereus*, ตะกอนทะเล

Abstract

The interest in environmental problems due to chemical contamination is continuously growing. Increasing demands to seek the sustainable and controllable process which do not burden the environment significantly is becoming interest. Biodegradation is one of the classic methods for removal of undesired organic compounds to concentrations that are undetectable or below limits established as acceptable by regulatory agencies. Major limitations are the bioavailability of the organic matter and the finding of efficient biodegraders.

Acrylamide ($\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$) is a chemical colorless and odorless crystal solid that is an essential industrial chemical with an estimated worldwide production of 200,000 tons per year. The major concentration of acrylamide in the environment comes from 1) food scraps cooked at high temperatures ($>120^\circ\text{C}$) thru Maillard reaction and 2) industrial wastes. It has a report describing acrylamide released to the environment about 200-500ppm. Since acrylamide is believed to be a neurotoxicant and probably human carcinogen, biodegradation of acrylamide to non-harmful substances would alleviate environmental concerns.

Microorganisms living in the sea have specially adapted features that allow them to live and grow in the extreme environment. Many organic compounds have been utilized by these microorganisms however no report could be found for toxicant removal. We discover a new acrylamide-degrading bacterium, *Bacillus cereus* from the sea sediments at 18 meters depth of Koh Chan, Samaesan. The strain grew well in the presence of acrylamide at concentration up to 0.8% (w/v), at pH value between 6.0 and 9.0 and $25\text{-}30^\circ\text{C}$. Degradation of acrylamide to acrylic acid started after 3 hours of cultivation and reach maximum at 24 hours. Our findings render marine bacteria attractive as an alternative source of biodegrader for acrylamide.

Keywords: Acrylamide, Biodegradation, Marine bacteria, *Bacillus cereus*, Marine sediments

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ	8
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	9
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	10
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	13
2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
2.1.1 การปนเปื้อนของสารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ในสิ่งแวดล้อม	14
2.1.2 เอนไซม์สลายไนไตรล์และเอไมด์	15
2.1.3 เอนไซม์เอไมเดส	15
2.1.4 การใช้แบคทีเรียและเอนไซม์สลายสารอะคริลาไมด์ สารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์	18
2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัย	23
3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	25
3.1 การโคลนนิ่งและแสดงออกกรีคอมบิแนนท์เอไมเดสจาก <i>E. aerogenes</i> ใน <i>Escherichia coli</i>	25
3.2 การค้นหาแบคทีเรียได้ทะเลที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อนอะคริลาไมด์	27
3.2.1 ตัวอย่างตะกอนทะเลที่นำมาศึกษา	27
3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียได้ทะเลที่สลายอะคริลาไมด์	27
3.2.3 การระบุชนิดของแบคทีเรีย	28
3.2.4 การศึกษาลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้	28
3.2.5 การติดตามความสามารถในการสลายอะคริลาไมด์ของแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้	29
4 ผลการวิจัย	30
4.1 การโคลนนิ่งและแสดงออกกรีคอมบิแนนท์เอไมเดสจาก <i>E. aerogenes</i> ใน <i>E. coli</i>	30
4.2 การคัดแยกและระบุชนิดแบคทีเรียได้ทะเลที่สามารถสลายอะคริลาไมด์	30
4.3 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้	33
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพในการสลายอะคริลาไมด์ของแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้	34

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	35
6 สรุปผลการวิจัย	37
บรรณานุกรม	38
ประวัติและผลงานของผู้วิจัย	48

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตำแหน่งและความลึกของตะกอนทะเลที่ทำการเก็บตัวอย่างมาศึกษา	27

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	วิธีการสลายไนโตรัสโดยเอนไซม์สลายไนโตรัส
2	การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เอไมเดส
3	การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์เอไมเดส
4	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอไมเดสให้เหมาะกับการเลือกใช้โคดอนของ <i>E. coli</i>
5	แผนที่ตัดจำเพาะของ pET100/D-Topo ที่บรรจุยีนเอไมเดสของ <i>E. aerogenes</i> ในบริเวณโคลน
6	การวิเคราะห์ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เอไมเดสจาก <i>E. aerogenes</i> ใน <i>E. coli</i> BL21
7	แผนภาพวงศาวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของ <i>Bacillus</i> sp. เทียบกับแบคทีเรียที่คัดแยกได้
8	การติดตามการเจริญของ <i>B. cereus</i> , ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยง, อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง และอัตราการเจริญในสภาวะที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นต่างกัน
9	การติดตามการสลายอะคริลาไมด์ในอาหารเลี้ยงของ <i>B. cereus</i>

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

%	=	ร้อยละ
°ซ	=	องศาเซลเซียส
°C	=	องศาเซลเซียส
atm	=	Atmosphere
bp	=	คู่เบส
CFU	=	Colony-forming unit
EC	=	Enzyme committee
HPLC	=	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (High performance liquid chromatography)
kDa	=	กิโลดาลตัน
l	=	ลิตร
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
OD	=	Optical density
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าพีเอช
ppm	=	Part per million
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

บทที่ 1

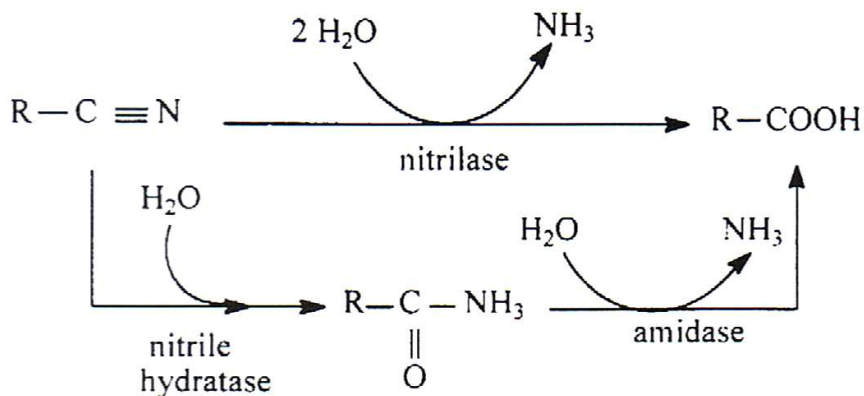
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารกลุ่มเอไมด์ (Amide) และไนไตรล์ (nitrile) ที่ใช้เป็นส่วนผสมสำคัญของยาฆ่าแมลง เป็นสารตกค้างกลุ่มใหญ่ที่พบในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีการตรวจพบการปนเปื้อนในพื้นที่ทางการเกษตรและแหล่งน้ำในบริเวณใกล้เคียงในเกือบทุกประเทศของทวีปยุโรปและอเมริกา (European Environment Agency, 1999; Barbash et al., 2001) นอกจากนี้หากสารประกอบอินทรีย์ดังกล่าวเกิดการสลายหรือเปลี่ยนรูปไปบางส่วน โดยกลไกทางชีวภาพที่เกิดจากแบคทีเรียที่ผิวดินและแหล่งน้ำ ยังอาจทำให้เกิดเป็นสารตัวกลาง (metabolite) ที่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่สามารถสลายทางชีวภาพได้อีกด้วย (Sinclair & Boxall, 2003; Boxall et al., 2004) ตัวอย่างเช่น สารตัวกลาง BAM (2,6-dichlorobenzamide) ที่เกิดจากการสลายยาฆ่าแมลงไดคลอเบนนิล (dichlobenil) ที่รู้จักในชื่อของไดคลอโรเบนโซไนไตรล์ (2,6-dichlorobenzonitrile) ที่ตรวจพบปริมาณสูงเกินค่าที่กำหนด (>0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร) ในตัวอย่างน้ำผิวดินในพื้นที่เกษตร จำนวน 5000 บริเวณที่ใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำดื่มของประเทศเดนมาร์ก จากการสำรวจการปนเปื้อนของ BAM ระหว่างปี ค.ศ. 1992-2002 (Geological Survey of Denmark and Greenland, 2004) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนในบริเวณแหล่งน้ำผิวดินของประเทศอื่นในทวีปยุโรป ได้แก่ เนเธอร์แลนด์ เยอรมนี อิตาลี และสวีเดน (Wolter et al., 2001; Kreuger et al., 2003; Versteegh & teBiesebeek, 2003; Porazzi et al., 2005;) ซึ่งเคยมีรายงานถึงความเป็นพิษของสารไนไตรล์และเอไมด์ ที่สามารถเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ (mutagenic) และก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogenic) ในสัตว์ทดลอง ที่ได้รับเข้าร่างกายปริมาณสูงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน (Nawaz et al., 1991; Pollak et al., 1991) แต่ในอีกด้านหนึ่ง สารไนไตรล์และเอไมด์ ยังจัดเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญกลุ่มหนึ่งและมีความต้องการสูงในอุตสาหกรรมเคมี ที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอินทรีย์จำนวนมาก ได้แก่ สารประกอบเอไมด์ เอมีน (amine) อะมิดีน (amidines) กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) เอสเทอร์ (ester) อัลดีไฮด์ (aldehyde) คีโตน (ketone) และสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic compound) ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง และนิยมนำไปใช้เป็นสารตัวกลางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตสีย้อม สารช่วยประสาน (emulsifiers) หรือตัวทำละลายในการผลิตยาฆ่าแมลง เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารสัตว์ องค์ประกอบในเครื่องสำอาง และยาปฏิชีวนะ เป็นต้น (Mathew et al., 1988; Kobayashi et al., 1992; Banerjee et al., 2002; Hu et al., 2007; Zheng et al., 2007)

ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่ได้รับความนิยมอย่างมากจากอดีตถึงปัจจุบัน เนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่อ่อนโยนและมีความจำเพาะสูงต่อสารตั้งต้นที่มีความหลากหลายของโครงสร้างทางเคมี โครงสร้างเรจีโอ และโครงสร้างสเตอริโอ ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ไม่มีการใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และสามารถควบคุมความปลอดภัยของปฏิกิริยาได้ (Nawaz et al., 1991; Sheldon & Rantwijk, 2004) นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์สารประกอบเคมีที่มีโครงสร้างซับซ้อน อย่างจำเพาะได้อีกด้วย (Patel, 2006) การใช้

จุลินทรีย์เปลี่ยนรูปสารเคมี (biotransformation) หรือการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (เอนไซม์) ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เปลี่ยนรูปหรือสลายสารพิษนั้นกำลังได้รับความสนใจอย่างมาก โดยปฏิกิริยาพื้นฐานที่จุลินทรีย์ใช้ในการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ (Banerjee et al., 2002) นั้น คือปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ที่เกิดจากการทำงานของกลุ่มเอนไซม์สลายไนไตรล์ (nitrile-degrading enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ไนไตร์ไฮเดรเตส (nitrile hydratase; EC 4.2.1.84), เอนไซม์ไนไตร์เลส (nitrilase; EC 3.5.5.1) และเอนไซม์เอไมเดส (amidase; EC 3.5.1.4) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีกำลังการซื้อขายมากและนิยมใช้เร่งปฏิกิริยาผลิตสารตัวกลางที่มีค่าในอุตสาหกรรมเคมี ยกตัวอย่างเช่น การใช้เอนไซม์ไนไตร์ไฮเดรเตส เปลี่ยนรูปสารกลุ่มไนไตรล์เป็นเอไมด์ (Asano et al., 1982a) และใช้เอนไซม์เอไมเดส เปลี่ยนเอไมด์ที่เกิดขึ้นเป็นกรดคาร์บอกซิลิกและแอมโมเนียต่อไป (Asano et al., 1982b) หรือการใช้เอนไซม์ไนไตร์เลสเปลี่ยนไนไตรล์เป็นกรดคาร์บอกซิลิกและแอมโมเนียในขั้นตอนเดียว (Nagasawa & Yamada, 1989; Kobayashi et al., 1990) ดังแสดงปฏิกิริยาในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 วิธีการสลายไนไตรล์โดยเอนไซม์สลายไนไตรล์

แบคทีเรียสลายไนไตรล์และเอไมด์ เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ได้รับการยืนยันแล้วว่า มีระบบเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนรูปสารประกอบไนไตรล์และเอไมด์ได้เป็นกรดคาร์บอกซิลิกและแอมโมเนีย ซึ่งมีการนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดสารพิษทางชีวภาพ (bioremediation) อย่างแพร่หลายจากอดีตจนถึงปัจจุบัน (DiGeronimo & Antoine, 1976; Yamada et al., 1976; Yamada et al., 1980; Bui et al., 1984; Nagasawa et al., 1988; Nawaz et al., 1989; Nawaz et al., 1991; Ramkrishna & Desai, 1993; Babu et al., 1995; Langdahl et al., 1996; Fallon et al., 1997; Dhillon & Shivaraman, 1999; Dias et al., 2000; Tauber et al., 2000; Dadd et al., 2001; Dias et al., 2001; Wang & Lee, 2001; Lee & Wang, 2004; Wang et al., 2004; Holtze et al., 2006; Kao et al., 2006; Zheng et al., 2008) เมื่อเร็วๆ นี้ห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์จากตัวอย่างน้ำทิ้งในแหล่งชุมชนของจังหวัดชลบุรี และระบุสายพันธุ์เป็น *Enterobacter aerogenes* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนเดียว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช ระหว่าง 6.0-9.0 เมื่อติดตามการสลายอะคริลาไมด์ของ *E. aerogenes* ในระดับเซลล์ พบว่าแบคทีเรียสามารถสลายอะคริลาไมด์ได้เป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนีย ในลักษณะที่ขึ้นกับจำนวนมวลชีวภาพ (biomass) และเมื่อปริมาณของเซลล์เข้าสู่

ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) แบคทีเรียจะสามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นสารประกอบที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าได้ นอกจากนี้ *E. aerogenes* ยังสามารถสลายสารกลุ่มเอไมด์และสารอนุพันธ์ได้หลายชนิด ที่คาร์บอนของการเปลี่ยนรูป (% conversion) ต่างกันคือ สามารถสลายบิวทิราไมด์ (butyramide) และยูเรีย (urea) ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่สลายแล็กตาไมด์ (lactamide) ได้ 86% สำหรับความสามารถในการสลายฟอร์มามาไมด์ (formamide) เบนซาไมด์ (benzamide) อะซีตาไมด์ (acetamide) ไฮยาโนอะซีตาไมด์ (cyanoacetamide) และโพรไพโอनाไมด์ (propionamide) เรียงลำดับจากมากไปน้อยได้เป็น 55.27%, 54.82%, 49.57%, 48.81% และ 30.20% แต่ไม่สามารถสลายเมทิลลีนบิสอะคริลาไมด์ (*N,N*-methylene bisacrylamide) โซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ไทโออะซีตาไมด์ (thioacetamide) และไอโอโดอะซีตาไมด์ (iodoacetamide) ได้ (Buranasilp & Charoenpanich, 2011)

เป็นที่ทราบดีแล้วว่า กระบวนการสลายเอไมด์ เป็นแอมโมเนียและกรดอะมิโนของแบคทีเรียสลายเอไมด์ (อะคริลาไมด์) นั้น เกิดจากการทำงานของเอนไซม์อะมิเดส ในปฏิกิริยาดีอะมีเนชัน (deamination) ในการดำเนินการวิจัยในปีที่ 1 คณะผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคพีซีอาร์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอไมเดสของ *E. aerogenes* พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนขนาด 726 คู่เบส ที่สามารถคาดเดาเป็นกรดอะมิโนจำนวน 242 ตัว และมีความคล้ายคลึงมากกว่าร้อยละ 80 กับยีนของเอนไซม์ในกลุ่มไนโตรเลส/ไฮยาโนไฮโดรเลส และเอไมเดสของแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่มีในฐานข้อมูลโลก และลำดับกรดอะมิโนที่คาดเดาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้ พบความเหมือนมากกว่า 88% กับเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกัน (Mangkalad & Charoenpanich, 2011, Mangkalad & Charoenpanich, unpublished data) เมื่อใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจำลองเป็นโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เอไมเดสจาก *E. aerogenes* พบว่าเอนไซม์มีโครงสร้างเป็นโปรตีนก้อนกลมแบบ α/β ที่ประกอบด้วย แอลฟา-ฮีลิกซ์ (α -helix) จำนวน 6 เกลียว และบีตา-ชีท (β -sheet) จำนวน 6 สายที่จับกันเป็นแผ่นเรียบ 2 แผ่น ที่มีความคล้ายคลึง 45% กับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไนโตรเลสจาก *Xanthomonas campestris* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนและไนโตรเจนที่ไม่ใช่พันธะเพปไทด์ ในกลุ่มของเอนไซม์สลายไนโตรล และมีการดัดแปลงที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ กรดอะมิโนกลูตาเมต ตำแหน่งที่ 27 (glutamic acid; E27) กรดอะมิโนไลซีน ตำแหน่งที่ 92 (lysine; K92) และกรดอะมิโนซิสเตอีน ตำแหน่งที่ 126 (cysteine; C126) และได้โคลนยีนเอไมเดสของ *E. aerogenes* ที่จำแนกได้เข้าสู่ *Escherichia coli* และเหนี่ยวนำการแสดงออกเอนไซม์อะมิเดสที่ได้ แต่พบว่าริคอมบิแนนท์เอนไซม์มีการแสดงออกที่มากเกินไปจนจับกันเป็นก้อนตกตะกอนภายในเซลล์ในรูปของอินคลูชันบอดี้ และเมื่อเติมยาปฏิชีวนะร่วมในอาหารเลี้ยงสำหรับการแสดงออก พบว่าไม่สามารถลดการแสดงออกของริคอมบิแนนท์เอไมเดสในรูปของอินคลูชันบอดี้ในเซลล์ได้

ปัจจุบัน ในหลายประเทศมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ หรือเซลล์ตรึงของจุลินทรีย์ (Immobilized cells) ในการสลายสารตกค้างจากกระบวนการอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาไม่นานและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อในภายหลัง สำหรับการกำจัดสารเอไมด์และไนโตรล เคยมีรายงานเช่นกันถึงการนำกลุ่มเอนไซม์สลายไนโตรล มาสลายสารเอไมด์และไนโตรลที่ตกค้างในกระบวนการอุตสาหกรรม หรือการเกษตร (DiGeronimo & Antoine, 1976; Yamada et al., 1976; Yamada et al., 1980; Bui et al., 1984; Nagasawa et al., 1988; Nawaz et al., 1989; Nawaz et al., 1991; Ramkrishna & Desai, 1993; Babu et al., 1995; Langdanhl et al., 1996; Fallon et al., 1997; Dhillon & Shivaraman, 1999; Dias et al.,

2000; Tauber et al., 2000; Dadd et al., 2001; Dias et al., 2001; Wang & Lee, 2001; Lee & Wang, 2004; Wang et al., 2004; Holtze et al., 2006; Kao et al., 2006; Zheng et al., 2008) แต่ทั้งนี้ ประสิทธิภาพในการสลายสารพิษของจุลินทรีย์ก็ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นความสามารถของจุลินทรีย์ที่จะตัดแปลงตัวเองให้เจริญในสภาวะแวดล้อมที่ต่างออกไป เช่น ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง สภาวะที่มีความเป็นกรดหรือด่าง สภาวะที่มีโลหะ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารพิษบางชนิดปนเปื้อน และปัญหาในเรื่องของการควบคุมการแพร่กระจายของจุลินทรีย์จากระบบบำบัดลงสู่แหล่งน้ำข้างเคียง ขณะเดียวกันการใช้เอนไซม์ในการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้าก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องต้นทุนการผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ที่จะนำมาใช้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการนำเข้าจากต่างประเทศ รวมทั้งเมื่อสลายด้วยเอนไซม์แล้ว จำเป็นต้องมีกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์กรดอะคริลิกที่ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สิ้นเปลืองเวลา ต้นทุน และพลังงาน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะผลิตเอนไซม์ตรึงรูปศักยภาพสูง สำหรับใช้ในการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ตัดแปลงกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเดส จาก *E. aerogenes* (Buranasilp & Charoenpanich, 2011; Mangkalad & Charoenpanich, 2011, Mangkalad & Charoenpanich, unpublished data) และตรึงรูปเอนไซม์ที่ผ่านการตัดแปลง เพื่อนำมาใช้ซ้ำสำหรับกระบวนการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป แต่เนื่องจากอุปสรรคในการแสดงออกรีคอมบิแนนท์เอไมเดสของ *E. aerogenes* ในการดำเนินการวิจัยปีที่ 1 จึงไม่สามารถทำการตรึงรูปเอนไซม์เอไมเดสต่อได้ ในการดำเนินการวิจัยปีที่ 2 นี้ คณะผู้วิจัยจึงเปลี่ยนแผนการดำเนินการวิจัยมาเป็นการค้นหาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสลายสารประกอบกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ เพื่อนำมาใช้ในรูปของเซลล์ตรึงสลายการปนเปื้อนของสารกลุ่มดังกล่าวแทน โดยในการดำเนินการวิจัยในปีที่ 2 นี้ จะมุ่งเน้นที่การค้นหาแบคทีเรียได้ทะเลที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อนอะคริลาไมด์ ซึ่งเป็นสารประกอบเอไมด์ที่พบการปนเปื้อนบ่อยในพื้นที่การเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ควบคุมไปกับความพยายามในการโคลนนิ่งและแสดงออกรีคอมบิแนนท์เอไมเดสจาก *E. aerogenes* ในระบบ *Escherichia coli*

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย ปีที่ 2

1. ค้นหาแบคทีเรียที่สามารถสลายสารปนเปื้อนอะคริลาไมด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. โคลนนิ่งและแสดงออกรีคอมบิแนนท์เอไมเดสจาก *E. aerogenes* ในระบบ *Escherichia coli*

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 การปนเปื้อนของสารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ในสิ่งแวดล้อม

สารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ที่ใช้เป็นส่วนผสมสำคัญของยาฆ่าแมลงหรือสารกำจัดวัชพืช (Banerjee et al., 2002) เป็นสารตกค้างกลุ่มใหญ่ที่พบในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีการตรวจพบการปนเปื้อนในพื้นที่ทางการเกษตรและในแหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียง ในเกือบทุกประเทศของทวีปยุโรปและอเมริกา (European Environment Agency, 1999; Barbash et al., 2001) นอกจากนี้หากสารประกอบอินทรีย์ดังกล่าวเกิดการสลายหรือเปลี่ยนรูปไปบางส่วนโดยกลไกทางชีวภาพที่เกิดจากแบคทีเรียที่ผิวดินและแหล่งน้ำ อาจทำให้เกิดเป็นสารตัวกลาง (metabolite) ที่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่สามารถสลายได้เองทางชีวภาพอีกด้วย (Sinclair and Boxall, 2003; Boxall et al., 2004) ยกตัวอย่างเช่น สารตัวกลาง BAM (2,6-dichlorobenzamide) ที่เกิดจากการสลายยาฆ่าแมลงไดคลอเบนนิล (dichlobenil) ที่รู้จักในชื่อของไดคลอโรเบนโซไนไตรล์ (2,6-dichloroben zonitrile) ที่ตรวจพบปริมาณสูงเกินค่าที่กำหนด (>0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร) ในตัวอย่างน้ำผิวดินของพื้นที่เกษตรกรรม จำนวน 5000 บริเวณที่ใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำดื่มของประเทศเดนมาร์ก จากผลการสำรวจการปนเปื้อนของ BAM ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1992 ถึง ค.ศ. 2002 (Geological Survey of Denmark and Greenland, 2004) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของ BAM ในบริเวณแหล่งน้ำผิวดินของประเทศอื่นในภาคพื้นยุโรป เช่น เนเธอร์แลนด์ เยอรมนี อิตาลี และสวีเดน อีกด้วย (Wolter et al., 2001; Kreuger et al., 2003; Versteegh and teBiesebeek, 2003; Porazzi et al., 2005;)

จากอดีตถึงปัจจุบันมีรายงานจำนวนไม่น้อยกล่าวถึงความเป็นพิษของสารกลุ่มไนไตรล์และเอไมด์ ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenic) และก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogenic) ในสัตว์ทดลองที่ได้รับสารกลุ่มดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายปริมาณสูงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน (Nawaz et al., 1991; Pollak et al., 1991) แต่ในอีกทางหนึ่ง สารไนไตรล์และเอไมด์ ก็ยังได้รับการยอมรับว่าเป็นสารประกอบที่มีความสำคัญกลุ่มหนึ่งและมีความต้องการสูงในอุตสาหกรรมเคมี โดยสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์สารอินทรีย์จำนวนมาก ได้แก่ สารประกอบเอไมด์, เอมีน, เอมีนีน, กรดคาร์บอกซิลิก, เอสเทอร์, อัลดีไฮด์, คีโตน และสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงและนิยมนำไปใช้เป็นสารตัวกลางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตพลาสติกและยาง การผลิตสีย้อม ระบบบำบัดน้ำทิ้ง เครื่องเขียนและหมึกพิมพ์ รวมทั้งใช้เป็นสารช่วยประสานหรือตัวทำละลายในการผลิตยาฆ่าแมลง เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารสัตว์ ส่วนประกอบในเครื่องสำอางและยาปฏิชีวนะ เป็นต้น (Mathew et al., 1988; Kobayashi et al., 1992; Banerjee et al., 2002; Hu et al., 2007; Zheng et al., 2007)

ในช่วงสิบปีที่ผ่านมา การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพสำหรับการสังเคราะห์สารเคมีทางอุตสาหกรรมได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่อ่อนโยนและมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง ทั้งแบบที่มีการคัดเลือกโครงสร้างเคมี (chemo-selectivity) โครงสร้างเรจิโอ (regio-selectivity)

และโครงสร้างอแนนทิโอเมอร์ (enantio-selectivity) รวมทั้งไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถดำเนินปฏิกิริยาได้โดยใช้เครื่องมือราคาถูกลง และสามารถควบคุมความปลอดภัยของปฏิกิริยาได้ (Nawaz et al., 1991; Sheldon and Rantwijk, 2004) นอกจากนี้การใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยายังสามารถทำการสังเคราะห์สารประกอบที่มีโครงสร้างเคมีซับซ้อนได้อีกด้วย (Patel, 2006)

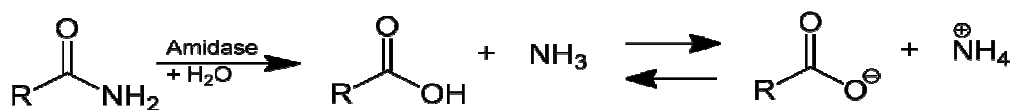
ในอีกทางหนึ่ง การเปลี่ยนหมู่เคมีด้วยกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์ (biotransformation) หรือการเลือกใช้เอนไซม์เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ของจุลินทรีย์ ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารเคมี สำหรับกระบวนการสลายทางชีวภาพสารกลุ่มไนไตรล์และเอไมด์ที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์นั้น จะมีเอนไซม์กลุ่มเฉพาะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) พันธะระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C-N bond) ที่อยู่ในโมเลกุลของสารกลุ่มดังกล่าวที่เรียกว่า เอนไซม์สลายไนไตรล์และเอไมด์ (Nitrile-amide hydrolyzing enzyme)

2.1.2 เอนไซม์สลายไนไตรล์และเอไมด์

เอนไซม์สลายไนไตรล์และเอไมด์ เป็นระบบเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในกระบวนการสลายไนไตรล์ที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถเกิดได้ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ที่บางครั้งเรียกว่า วิธีทางตรง เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ไนไตรเลส (nitrilase) เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไนไตรล์ เป็นกรดคาร์บอกซิลิกและแอมโมเนีย และวิธีที่ 2 เป็นปฏิกิริยาควบคู่สองปฏิกิริยาที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไนไตรล์ไฮเดรเตส (nitrile hydratase) เปลี่ยนรูปไนไตรล์เป็นเอไมด์ ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาต่อไปจากการทำงานของเอนไซม์เอไมเดส (amidase) เปลี่ยนผลิตภัณฑ์เอไมด์ที่เกิดขึ้นเป็นเป็นกรดคาร์บอกซิลิกและแอมโมเนีย โดยในปัจจุบันเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ได้รับความสนใจนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้นในอุตสาหกรรมเคมีที่มีการสังเคราะห์กรดอินทรีย์ (Gao et al., 2007; Song et al., 2007; Wang et al., 2007) โดยเฉพาะเอนไซม์ไนไตรล์ไฮเดรเตสที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพื้นฐานของกระบวนการผลิตสารอะคริลามิด (acrylamide) และสารประกอบเอไมด์หลายชนิด (Endo et al., 2001; Yamada & Kobayashi, 1996) โดยทั่วไปยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ไนไตรล์ไฮเดรเตสนี้มักจะมีการจัดเรียงตัวในรูปของโอเปรอน (operon) ที่ประกอบด้วยยีนสองยีน (เรียกว่าเป็นหน่วยย่อยแอลฟา- และหน่วยย่อยบีต้า- ของเอนไซม์) คือ ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนกระตุ้นของเอนไซม์ไนไตรล์ไฮเดรเตส (nitrile hydratase activator) และยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอไมเดส ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาควบคู่เปลี่ยนรูปไนไตรล์เป็นกรดคาร์บอกซิลิกและแอมโมเนียได้ (Mayaux et al., 1991)

2.1.3 เอนไซม์เอไมเดส

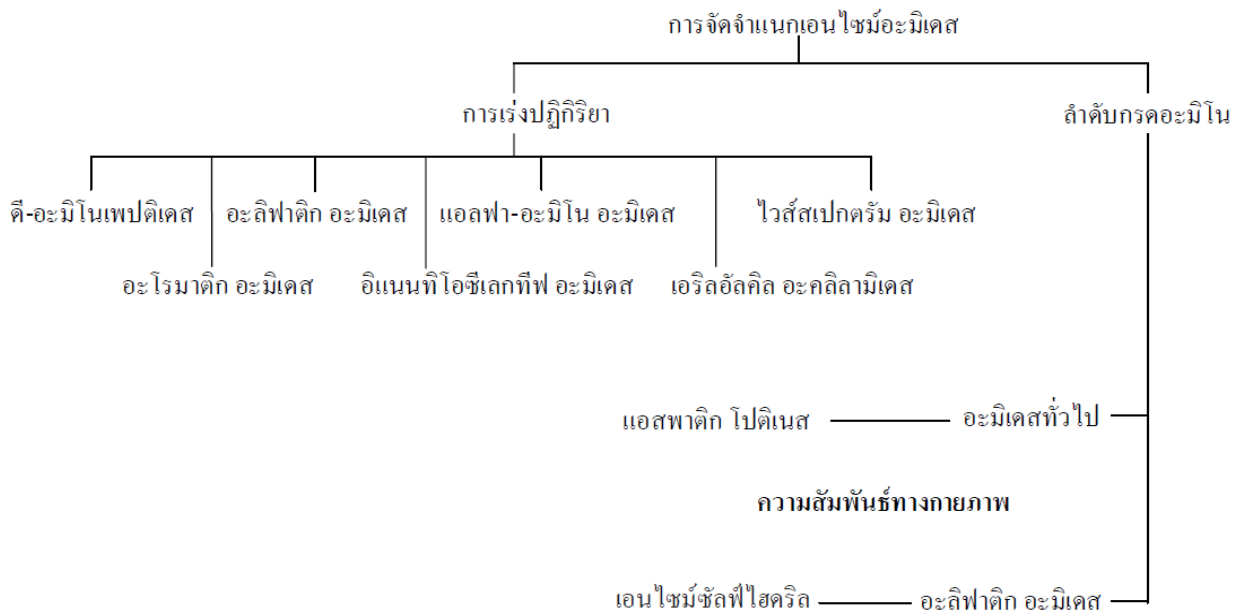
เอนไซม์เอไมเดสหรือเอนไซม์อะมิโดไฮโดรเลส (amidohydrolase) มีเลขตามระบบคือ EC 3.5.1.4 จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กรดคาร์บอกซิลิกเอไมด์ โมเลกุลเดี่ยว (monocarboxylic acid amide) ได้ผลิตภัณฑ์สองชนิดคือ คาร์บอกซิเลต (carboxylate) และเอมีน (amine) ในรูปของแอมโมเนีย ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งพบได้ทั่วไปทั้งในเซลล์โพรคาริโอต (prokaryotic cells) และเซลล์ยูคาริโอต (eukaryotic cells) โดยเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน (nitrogen metabolism)



ภาพที่ 2 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เอไมเดส (Sharma et al., 2009)

เอนไซม์เอไมเดสเป็นเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลายในกระบวนการอุตสาหกรรมเคมีและทางเภสัชกรรม โดยใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสารกลุ่มเอไมด์ แบบที่มีความจำเพาะทางเคมี (chemo-selective) โครงสร้างเรจีโอ (regioselective) และโครงสร้างอีนันทิโอเมอร์ (enantioselective) เพื่อผลิตสารประกอบบริสุทธิ์ เช่น ยาปฏิชีวนะ (ใช้เอนไซม์เพนนิซิลินอะซิเลส, penicillin acylase) การผลิตเพปไทด์ (ใช้เอนไซม์เพปไทด์เอไมเดส, peptide amidase) การวิเคราะห์ไกลโคโปรตีน (ใช้เอนไซม์กลุ่มแอสพาราจีนเอไมเดส, peptide-N4-(N-acetyl-β-D-glucosainyl) asparagines amidase) และการเปลี่ยนวงของอิมิด (imide) (ใช้เอนไซม์อิมิดเอส, imidase) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์เอไมเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะคริลิก ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างหลักในการสังเคราะห์อะคริลิกเอสเทอร์ (acrylic ester) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์สำหรับโพลีอะคริลิก (polyacrylic acid) ในอุตสาหกรรมการผลิตสีและการขัดเงาเครื่องหนัง หรือใช้เป็นโมโนเมอร์ร่วม (co-monomer) กับเอทิลีน (ethylene) ได้เป็นโพลีเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เรซินที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange resin) สำหรับใช้ในการผลิตเครื่องกรองหรือเครื่องกลั่นน้ำ ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น (Lira & McCrackin, 1993; Danner *et al.*, 1998)

เนื่องจากเอนไซม์เอไมเดสแต่ละชนิดมีกลไกการเร่งปฏิกิริยาที่มีความแตกต่างกัน จึงทำให้การจัดจำแนกกลุ่มของเอนไซม์เอไมเดสยังไม่ชัดเจนนัก ส่วนใหญ่จะจัดจำแนกตามชนิดของการเกิดปฏิกิริยา ลำดับกรดอะมิโน และความใกล้เคียงของวงศ์วานวิวัฒนาการ (Chebrou *et al.*, 1996; Pace & Brenner, 2001; Fournad & Arnaud, 2001; Pertsovich *et al.*, 2005) โดยทั่วไปเอนไซม์เอไมเดสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 4 ชนิด คือ ปฏิกิริยาอะมิโดทรานส์เฟอเรส (amidotransferase activity) ปฏิกิริยาเอซิลทรานส์เฟอเรส (acyltransferase activity) ปฏิกิริยาเอซิดทรานส์เฟอเรส (acidtransferase activity) และ ปฏิกิริยาเอสเทอร์ทรานส์เฟอเรส (estertransferase activity) จึงทำให้เอนไซม์เอไมเดสสามารถทำปฏิกิริยาได้กับสับสเตรทที่หลากหลาย และหากทำการจัดจำแนกกลุ่มของเอนไซม์เอไมเดสตามชนิดของการเกิดปฏิกิริยาโดยอาศัยความจำเพาะกับสับสเตรทที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งเอนไซม์เอไมเดสได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่และมีการกำหนดเลขตามระบบคือ EC 3.5.1 (ประกอบด้วยเอนไซม์ทั้งสิ้น 77 ชนิด มีเลขตามระบบคือ 3.5.1.1-3.5.1.77) ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายอะลิฟาติกเอไมด์สายสั้น (short-chain aliphatic amide) เช่น อะซีตามิด (acetamide) อะคริลามิด (acrylamide) และโพรไพโอนามิด (propionamide) เป็นต้น และ EC 3.5.2 (ประกอบด้วยเอนไซม์ทั้งสิ้น 14 ชนิด ที่มีเลขตามระบบตั้งแต่ 3.5.2.1 ถึง 3.5.2.14) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการสลายอะลิฟาติกเอไมด์สายยาว เช่น ไอโซบิวทิรามิด (isobutyramide) วาลิรามิด (valeramide) และเฮกซานเอไมด์ (hexanoamide) โดยต้องทำปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์ไนไตรล์ไฮโดรเลส และมักเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมในการสลายไนไตรล์ (nitrile metabolism) ของแบคทีเรีย แต่หากแบ่งเอนไซม์เอไมเดสตามชนิดของสับสเตรทและลักษณะการเร่งปฏิกิริยาจะสามารถแบ่งได้เป็น 7 กลุ่ม ดังสรุปในภาพที่ 3 ซึ่งชนิดของเอนไซม์เอไมเดสที่หาได้ง่ายในแบคทีเรียและนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมสูงสุดคือ เอนไซม์เอซิลามิด อะมิโดไฮโดรเลส (acylamide amidohydrolase; EC 3.5.1.4) ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายอะลิฟาติกเอซิลามิด (aliphatic acylamide) ได้เป็นคู่กรดคาร์บอกซิลิกและแอมโมเนีย



ภาพที่ 3 การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์อะไมเดสที่เสนอโดย Monica Sharma และคณะ (2009)

ในปัจจุบันยังนิยมนำเอนไซม์อะไมเดสมาใช้ในการเปลี่ยนรูปสารกลุ่มไนโตรลและเอไมด์ เพื่อผลิตกรดอินทรีย์ (organic acids) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น กรดอะคริลิก (acrylic acid) กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (*p*-aminobenzoic acid) กรดไพราซิโนอิก (pyrazinoic acid) กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) เป็นต้น และยังสามารถนำคุณสมบัติในการเปลี่ยนรูปสารมาใช้ในการกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ สารปนเปื้อนกลุ่มไนโตรลและเอไมด์ที่มักพบการตกค้างในบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมและพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้ยาฆ่าแมลงจำนวนมาก (Barsomine et al., 1990, Benerjee et al., 2002, Fournand & Arnaud, 2001; Sugai et al., 1997) ดังกล่าวมาแล้ว

สำหรับการจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์อะไมเดสตามความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน โดยทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่เคยมีรายงาน พบความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์อะลิฟาติกอะไมเดสกลุ่มที่ 1 (EC 3.5.1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ไนไตรเลส, ไฮยาไนด์ไฮเดรทาเลส (cyanide hydratase) และ บีต้า-อะลานินซินเทส (β -alanine synthase) ซึ่ง Bork และ Koonin (1994) เคยรายงานว่าเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์และการผลิตแอมโมเนีย โดยมีบริเวณโมทีฟ (motif) หลายบริเวณที่มีความอนุรักษ์ โดยพบว่ากรดอะมิโนซีสเทอีนและกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนที่มีความอนุรักษ์สูงและอาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 Chebrou และคณะได้ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์อะฟาติกเอไมด์กลุ่มที่ 2 (EC 3.5.2) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์อินโดลอะซิตาไมด์ไฮโดรเลส (indole-acetamide hydrolase) หลายชนิด, 6-อะมิโนเฮกซาโนอะซีไซคลิกไดเมอร์ไฮโดรเลส (6-amino hexanoatecyclic-dimer hydrolase; EC 3.5.2.12) และอะไมเดสจากยีสต์และฟังไจหลายชนิด (EC 3.5) โดยพบว่ามีโครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) ที่คล้ายคลึงกันคือมีการจับตัวเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนไดเมอร์

(homodimeric complex) หรืออ็อกตาเมอร์ (homooctameric complex) ที่คล้ายกันมาก (Kobayashi et al., 1997; Novo et al., 1995; Chebrou et al., 1996; Mayaux et al., 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ทั้งหมดมีบริเวณโมทีฟที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีนและเซรีน (GGSS motif) ที่มีความอนุรักษ์สูงและน่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการเร่งปฏิกิริยา และยังมีกรดอะมิโนที่พบความอนุรักษ์ที่ตำแหน่งหลังจากบริเวณโมทีฟ GGSS คือ ไกลซีน แอสปาติก และเซรีน ที่ตำแหน่ง 17 19 และ 23 หลัง (downstream) จากบริเวณโมทีฟ GGSS (Chebrou et al., 1996) และเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์และการผลิตแอมโมเนียเช่นกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนทำให้แบ่งเอนไซม์เไมเดสทั้งสองกลุ่มได้เป็นกลุ่มเดียวกัน ที่มีการจับตัวเป็นโครงสร้างโฮโมเทตราเมอร์ (homotetrameric structure) หรือโครงสร้างโฮโมเฮกซาเมอร์ (homohexameric structure) ในรูปที่แอคทีฟ ซึ่งชอบเร่งปฏิกิริยาการสลายอะลิฟาติกเอไมด์สายสั้น (Fournand & Arnaud, 2001; Pertsovich et al., 2005)

สำหรับการจัดจำแนกกลุ่มของเอนไซม์เไมเดสจากความใกล้เคียงของวงศ์วานวิวัฒนาการพบว่า ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์อะลิฟาติกเไมเดสนั้นมีความใกล้เคียงทางวงศ์วานวิวัฒนาการกับยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ไนโตรเลส และพบว่ามีการฐานทางวิวัฒนาการมาจากกลุ่มเอนไซม์ซัลไฟด์ไรล (sulfhydryl enzyme family) โดยมีรายงานว่ากรดอะมิโนซิสเทอีนเป็นกรดอะมิโนหลักที่ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ในกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งมีการยืนยันจากแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เไมเดสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่ถูกสร้างขึ้นโดยใช้โครงสร้างของฟลิกเอนไซม์ไนโตรเลส NitFhit เป็นแบบจำลองแม่แบบ พบบริเวณที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไนโตรเลสคือ Cys-Glu-Lys (Novo et al., 2002) และพบกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับบริเวณแอคทีฟ ซึ่งมีความอนุรักษ์สูงในกลุ่มเอนไซม์เไมเดสที่มีการคัดเลือกโครงสร้างอีนันทิโอ คือ Asp¹⁹¹ และ Ser¹⁹⁵ ซึ่งเคยมีรายงานมาแล้วว่าการแทนที่ Asp ตำแหน่งที่ 191 ด้วย Asn และการแทนที่ Ser ตำแหน่งที่ 195 ด้วย Ala ในยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เไมเดสของ *Rhodococcus* sp. นั้นส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์เไมเดสลดลงได้ (Novo et al., 1995) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนเหล่านี้ยังพบได้ในบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์แอสปาติกโปรตีนเนส (aspartic proteinase) อีกด้วย ดังนั้นจึงมีข้อสรุปที่อาจจะเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เไมเดสที่เร่งปฏิกิริยาแบบคัดเลือกโครงสร้างอีนันทิโอเมอร์ซึ่งต้องเร่งปฏิกิริยาควกับเอนไซม์ไนโตรเลสเไมเดสเหล่านั้นมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับเอนไซม์แอสปาติกโปรตีนเนส ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 2000 Karmali และคณะ ได้ทดลองเปลี่ยนกรดอะมิโนกลูตามิกตำแหน่งที่ 96 เป็นวาเลอีนของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เไมเดสของ *P. aeruginosa* แล้วพบว่าส่งผลให้เกิดการแยกตัวของหน่วยย่อยจากโครงสร้างเฮกซาเมอร์เป็นโครงสร้างไดเมอร์ ที่ส่งผลให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดได้

2.1.4 การใช้แบคทีเรียและเอนไซม์สลายสารอะคริลาไมด์ สารกลุ่มเอไมด์และไนโตรล

ในอดีตมีรายงานการค้นพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลายสารกลุ่มเอไมด์ได้ ทั้งกลุ่มอะลิฟาติก (aliphatic) และกลุ่มอะโรมาติก (aromatic) (Friedrick & Mitrenga, 1981; Grant & Wilson 1973; Hynes & Pateman, 1970; Kagayama & Ohe, 1990) แต่สำหรับสารอะคริลาไมด์นั้น ยังไม่ค่อยมีการค้นพบจุลินทรีย์ที่สามารถใช้อะคริลาไมด์เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญมากนัก ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากผลกระทบของสารอะคริลาไมด์ที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูตาไทโอนเอส-ทรานส์เฟอเรส (glutathione-s-transferase) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดสารพิษภายในเซลล์ (detoxication) โดยการเข้าจับกับหมู่ซัลไฟด์ไรล (sulfhydryl group) ของเอนไซม์ดังกล่าว (Dixit et al., 1980) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ (Cavins

& Friedman, 1968) ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้วิธีการกำจัดตกค้างของสารอะคริลาไมด์ในอดีตทำได้เพียงแค่การโพลีเมอร์ไรส์อะคริลาไมด์ให้เป็นโพลีอะคริลาไมด์ ซึ่งเป็นรูปที่ไม่มีพิษ แต่จากข้อจำกัดของปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันที่ต้องใช้สารเคมีเพิ่มเติมที่มีราคาแพง เช่น แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulphate) และทีเมด (N, N, N', N'-tetramethylenediamine; TEMED) สำหรับให้อนุมูลอิสระในการเริ่มต้นของปฏิกิริยาและเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชัน ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบปัญหาการโพลีเมอร์ไรส์ที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete polymerization) ของสารอะคริลาไมด์และการสลายได้เองของโพลีอะคริลาไมด์เป็นอะคริลาไมด์อีกครั้งเมื่อถูกความร้อนหรือแสง (Smith et al., 1996) จากปัญหาดังกล่าว กระตุ้นให้นักวิจัยหันกลับมาสนใจศึกษาการกำจัดอะคริลาไมด์โดยใช้จุลินทรีย์บำบัด (bioremediation) อีกครั้ง เพราะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและมีราคาไม่แพง

จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ประโยชน์จากอะคริลาไมด์เป็นแหล่งพลังงานและสารอาหารในการเจริญนั้น มีการค้นพบครั้งแรกจากตัวอย่างน้ำในแม่น้ำและดิน (Brown et al., 1982; Cherry et al., 1956; Croll et al., 1974; Lande et al., 1979) แต่ไม่ได้มีการคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์อย่างแน่นอน จนกระทั่งในปีค.ศ. 1982 Asano และคณะ ได้ทำการคัดเลือก *Pseudomonas chlororaphis* B23 จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ ทำให้หลังจากนั้นได้มีการค้นพบและศึกษาคุณสมบัติในการสลายสารอะคริลาไมด์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ หลากหลายมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นใน *Rhodococcus rhodochrous* J1, *P. stutzeri*, *Xanthomonas maltophilia*, *R. erythropolis*, *Rhodopseudomonas palustris* (Hirrlinger et al., 1996; Nagasawa & Yamada, 1989; Nawaz et al., 1993; Nawaz et al., 1994; Shanker et al., 1990; Wang & Lee, 2001; Wampler & Ensign, 2005; Zabaznaya et al., 1998)

กลไกการสลายอะคริลาไมด์เริ่มต้นโดยอาศัยปฏิกิริยาดีอะมิเดชัน (deamidation) จากการทำงานของเอนไซม์เอไมเดสหรือที่รู้จักกันว่าเอนไซม์อะมิโดไฮโดรเลส เปลี่ยนอะคริลาไมด์เป็นแอมโมเนียและกรดอะคริลิก (acrylic acid) หรือที่รู้จักในชื่ออะคริเลต (acrylate) (Nawaz et al., 1998, Nawaz et al., 1994, Shanker et al., 1990, Sluis et al., 2002) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีพิษน้อยลงและไม่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต (Verschuere, 1977) ที่จะถูกสลายต่อไปโดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสลายอะคริเลต (acrylate catabolism) ที่มีอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้น เช่น เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เป็นบีตา-ไฮดรอกซีโพรไพโอเนต (β -hydroxypropionate) ที่จะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ หรือเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) เป็นโพรไพโอเนต (propionate) โดยการทำงานของเอนไซม์กลุ่มอะคริลิกเอซิดรีดักเทส (acrylic acid reductase) เป็นต้น (จิตติมา เจริญพานิช, 2551; Wampler & Ensign, 2005)

ปัจจุบันในหลายประเทศ มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ในการสลายสารตกค้างจากกระบวนการอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาไม่นานและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบในภายหลัง สำหรับการกำจัดอะคริลาไมด์เคยมีรายงานเช่นกันถึงการนำเอนไซม์เอไมเดสบริสุทธิ์มาใช้ในการบำบัด อะคริลาไมด์ที่ตกค้างในถังพักน้ำของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม (Nawaz et al., 1993; Nawaz et al., 1998; Prabu & Thatheyus, 2007; Wang & Lee, 2001) เช่นงานวิจัยของ Nagasawa และ Yamada (1989) ที่นำเอนไซม์เอไมเดสบริสุทธิ์ จากเซลล์แบคทีเรียที่ใช้อะคริลาไมด์ในการเจริญมาล้างพิษอะคริลาไมด์และใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในกระบวนการผลิตกรดอะคริลิกในระดับปริมาณมาก หรืองานวิจัยของ Shanker และคณะ ในปี 1990 ที่แยก *Pseudomonas* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) รูปแท่งขนาดเล็ก (short rod)

เคลื่อนที่ได้ (motile) และต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic) จากดินในสวนเขตร้อนโดยวิธีการบำรุง (enrichment) ในอาหารที่มีอะคริลาไมด์ โดยพบว่าแบคทีเรียที่สามารถสลายอะคริลาไมด์ได้ถึง 4 กรัมต่อลิตร เป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนียเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญ โดยใช้เอนไซม์เอไมเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะคริลาไมด์ ซึ่งจะทำงานได้ดีในเอไมด์สายสั้น (short chain amides) ได้แก่ ฟอร์มาไมด์ (formamide) อะซีตาไมด์ (acetamide) แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอนุพันธ์ของอะคริลาไมด์ (acrylamide analogues) เช่น เมทาคริลาไมด์ (methacrylamide) และเมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ (*N,N*-methylene bisacrylamide) ความสามารถของเอนไซม์จะถูกกดดัน (repression) ได้โดยซัคซิเนต (succinate) ในสภาวะที่มีและไม่มีแหล่งไนโตรเจน

หรือในปี ค.ศ. 1993 Nawaz และคณะ ทำการแยก *Pseudomonas* และ *X.maltophilia* และประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงหรือ เอนไซม์เอไมเดส ที่ผลิตจากเชื้อเหล่านี้ ในการสลายการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ และต่อมาในปี 1994 คณะผู้วิจัยเดียวกันทำการแยก *Rhodococcus* ที่ใช้อะคริลาไมด์เป็นสารตั้งต้นในการเจริญ จากดินที่มีการเจือปนของยาฆ่าแมลง และทำบริสุทธิ์รวมทั้งศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์เอไมเดสบริสุทธิ์ที่ได้ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 360 กิโลดอลตัน ที่ประกอบด้วยแปดหน่วยย่อย (subunit) สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชเท่ากับ 8.5 มีค่า pI (isoelectric point) ที่ 4.0 เอนไซม์มีความจำเพาะสูงกับอะคริลาไมด์และอะซีตาไมด์ นอกจากนี้ยังพบว่า โมเลกุลของเอนไซม์ประกอบด้วยเหล็กแปดโมล แอคติวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้โดยโลหะหนักและสารที่ขัดขวางหมู่ไทโอล (thiol blocking reagents) กรดอะมิโน 18 ตัวแรกที่ปลายอะมิโนแสดงความใกล้เคียง (homology) ร้อยละ 88 กับเอนไซม์อะลิฟาติกเอไมเดสใน *Brevibacterium* sp. Strain R312

Hirrlinger และคณะ (1996) แยก *R. erythropolis* จากเชื้อที่สลายเอริลโพรไพโอเนอไมด์ (2-arylpropionamides) พบว่าสามารถสลายอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนียได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งในปีเดียวกัน Nawaz และคณะ ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เอไมเดสที่สามารถสลายอะคริลาไมด์และอะลิฟาติกเอไมด์จาก *Klebsiella pneumonia* NCTR1 พบว่าเอนไซม์มีลักษณะเป็นโมโนเมอร์ที่มีมวลโมเลกุล 62,000 ดาลตัน ทำงานได้ดีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 และที่อุณหภูมิเท่ากับ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์บริสุทธิ์มีหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl group; -SH) อยู่ในบริเวณแอคทีฟ (active sites) และช่วยในการเร่งปฏิกิริยา และพบว่าโมเลกุลของเอนไซม์มีโคบอลต์ (Co^{2+}) และเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นองค์ประกอบด้วย

ต่อมาในปี 1998 Nawaz และคณะ ทำการทดสอบปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อกระบวนการสลายอะคริลาไมด์โดยเซลล์ตรึง *Rhodococcus* sp. พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงของอะคริลาไมด์ 128 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรียได้ และในที่อุณหภูมิสูงๆ ความสามารถในการสลายอะคริลาไมด์ก็จะเพิ่มมากขึ้น ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการสลายอะคริลาไมด์ของเซลล์ตรึงคือที่ 7.0 โลหะคอปเปอร์ (Cu^{2+}) และนิกเคิล (Ni^{2+}) สามารถยับยั้งการสลายอะคริลาไมด์ได้ แสดงว่า ในบริเวณแอคทีฟของเอนไซม์เอไมเดสที่เร่งปฏิกิริยาการสลายอะคริลาไมด์ประกอบด้วยหมู่ซัลไฮดริล ส่วนอัตราเร็วในการสลาย (rates of degradation) เพิ่มขึ้นได้โดยการเหนี่ยวนำของเหล็ก และจะลดลงได้จากสารพวงกลีเลเตอร์ (chelator) เช่น EDTA หรือ 1,10-phenanthroline บ่งชี้ถึงความเกี่ยวข้องของเหล็กในบริเวณเร่งของเอนไซม์เอไมเดส นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ตรึงที่เตรียมแล้วสามารถเก็บไว้ใช้งานต่อได้นานถึงสิบวัน โดยไม่มีผลกระทบต่ออัตราการสูญเสียอัตราการสลายอะคริลาไมด์แต่อย่างใด

สำหรับงานวิจัยในประเทศไทยนั้นได้มีรายงานถึงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสลายอะคริลาไมด์ในระดับห้องปฏิบัติการคือ *Enterobacter aerogenes* และ *Kluyvera georgiana* ที่คัดแยกมาจากน้ำทิ้งชุมชนในจังหวัดชลบุรี ซึ่งพบว่า *E. aerogenes* สามารถเจริญได้ดีที่ค่าพีเอช 6.0-9.0 และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ขณะที่ของ *K. georgiana* คือ ที่ค่าพีเอช 5.0-7.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้ประโยชน์สารอะคริลาไมด์ได้ที่มีความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) การย่อยสลายสารอะคริลาไมด์ เป็นกรดอะคริลิกนั้น จะเริ่มในช่วงปลายของระยะเจริญแบบลอการิทึมในลักษณะที่ขึ้นกับมวลชีวภาพของแบคทีเรีย เมื่อวิเคราะห์ความสมดุลของมวลพบว่า แบคทีเรียทั้งสองสามารถเปลี่ยนสารอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิกและสารประกอบที่มีความเข้มข้นต่ำสองชนิด ที่ร้อยละการเปลี่ยนมากกว่า 90 และยังสามารถสลายสารอะคริลาไมด์ได้หลายชนิด ที่ไม่อยู่ในรูปของสารอนุพันธ์เอไมด์ โดยมีความสามารถในการสลายสารเอไมด์สายสั้นและยูเรียได้ที่ร้อยละการเปลี่ยนมากกว่า 80 (Buranasilp & Charoenpanich, 2011; Thanyachoen et al., 2012) การค้นพบนี้แสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจของแบคทีเรียใหม่ทั้งสองสายพันธุ์ ที่จะนำมาใช้ในการสลายทางชีวภาพ สารอะคริลาไมด์และสารอะคริลาไมด์อื่น ๆ ที่พบในสิ่งแวดล้อม

แบคทีเรียสลายไนไตรล์และเอไมด์ เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ได้รับการยืนยันแล้วว่า มีระบบเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนรูปสารประกอบไนไตรล์และเอไมด์ได้เป็นกรดคาร์บอกซิลิกและแอมโมเนีย ซึ่งมีการนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดสารพิษทางชีวภาพ (bioremediation) อย่างแพร่หลาย จากอดีตจนถึงปัจจุบัน (DiGeronimo & Antoine, 1976; Yamada et al., 1976; Yamada et al., 1980; Bui et al., 1984; Nagasawa et al., 1988; Nawaz et al., 1989; Nawaz et al., 1991; Ramkrishna & Desai, 1993; Babu et al., 1995; Langdanhl et al., 1996; Fallon et al., 1997; Dhillon & Shivaraman, 1999; Dias et al., 2000; Tauber et al., 2000; Dadd et al., 2001; Dias et al., 2001; Wang & Lee, 2001; Lee & Wang, 2004; Wang et al., 2004; Holtze et al., 2006; Kao et al., 2006; Zheng et al., 2008) และมีรายงานวิจัยจำนวนมากยืนยันแล้วว่า เอนไซม์ไนไตรเลส มักเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยากับสารกลุ่มอะโรมาติกไนไตรล์ (aromatic nitrile) เช่น เอริลอะซิโตนไนไตรล์ (arylacetonitrile) เบนโซไนไตรล์ (benzonitrile) และโครโตโนไนไตรล์ (crotononitrile) ดังที่เคยมีรายงานมาแล้วในแบคทีเรียกลุ่ม *Rhodococcus*, *Fusarium* และ *Bacillus* (Harper, 1977a; Harper, 1977b; Harper, 1985; Goldlust & Bohak, 1989; Kobayashi et al., 1989; Kobayashi et al., 1990; Hoyle et al., 1998; Almatawah et al., 1999; Nagasawa et al., 2000) ขณะที่ระบบเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดรอะเตส/เอไมเดส นั้นมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นอะลิฟาติกไนไตรล์ (aliphatic nitrile) เฮเทอโรไซคลิกไนไตรล์ (heterocyclic nitrile) และเอไมด์ เช่น อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) อะคริโลไนไตรล์ (acrylonitrile) อะมิโนโพรไพโอไนไตรล์ (aminopropionitrile) ไพยาซิไนไตรล์ (pyrazinitrile) อะคริลาไมด์ (acrylamide) ไฮดรอกซีฟีนิลอะซีตาไมด์ (hydroxyphenylacetamide) และไพราซิनाไมด์ (pyrazinamide) มากกว่าซึ่งเคยมีรายงานในแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus*, *Rhodococcus* และ *Klebsiella* (Tauber et al., 2000; Reilly & Turner, 2003; Kao et al., 2006; Okamoto & Eltis, 2007; Zheng et al., 2008) ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Holtze และคณะในปี ค.ศ. 2006 ที่รายงานว่าเอนไซม์ไนไตรเลสในแบคทีเรียที่แยกจากดิน ชอบที่จะสลายเบนโซไนไตรล์ มากกว่าสารกลุ่มอะลิฟาติกไนไตรล์ ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับเอนไซม์ไนไตรเลสของ *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 ที่รายงานโดย Hoyle และคณะ ในปี ค.ศ. 1998 ขณะที่ Maestracci และคณะ (1984) พบว่าระบบเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดรอะเตส/เอไมเดสใน

Brevibacterium sp. R312 มีความจำเพาะกับสับสเตรทที่หลากหลาย ได้แก่ อะซิโตไนไตรล์, โพรไพโอไนไตรล์, อะคริโลไนไตรล์ และเมทาอะคริโลไนไตรล์ (methacrylonitrile) รวมทั้งสารประกอบอะลิฟาติกเอไมด์สายสั้น เช่น อะคริลาไมด์และอะซีตาไมด์ (acetamide) เป็นต้น

ในปี ค.ศ. 2000 Tauber และคณะ ใช้ระบบเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเตส/เอไมเดส ของ *Rhodococcus rhodochrous* สลายอะคริลิกไฟเบอร์ (acrylic fiber) และโพลีอะคริโลไนไตรล์ ขณะที่ Kao และคณะ (2006) ศึกษาการใช้ระบบเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเตส/เอไมเดส ของ *Klebsiella oxytoca* สลายไนไตรล์หลายชนิด พบว่า เอนไซม์มีความจำเพาะกับซัคซิโนไนไตรล์ (succinonitrile) วาลีโรไนไตรล์ (valeronitrile) อะซิโตไนไตรล์ และ โพรไพโอไนไตรด์ หรืองานวิจัยของ Okamoto และ Eltis (2007) ที่รายงานว่า เอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเตสบริสุทธิ์จาก *Rhodococcus* sp. RHA1 ชอบที่จะสลายอะซิโตไนไตรล์และโพรไพโอไนไตรล์ (ค่า k_{cat}/K_m ประมาณ $7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) มากกว่าอะคริโลไนไตรล์และบิวทิโรไนไตรล์ ขณะที่งานวิจัยของ Zheng และคณะ (2008) พบว่าเอนไซม์ไนไตรเลสของ *Bacillus subtilis* ZJB-063 มีความจำเพาะสูงกับเอริลอะซิโตไนไตรล์ แต่ระบบเอนไซม์ไนไตรล์-ไฮดราเตส/เอไมเดส ในแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถใช้สับสเตรทเอริลอะซิโตไนไตรล์ได้เลย

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวกับการโคลนยีนและแสดงออกปริมาณสูงเอนไซม์เอไมเดสที่จำเพาะต่ออะคริลาไมด์และ/หรือสารกลุ่มเอไมด์ นั้นยังพบรายงานไม่มากนัก ที่มีรายงานได้แก่ รายงานวิจัยของ Cheong และ Oriel ในปี ค.ศ. 2000 ที่ทำการโคลนยีนเอไมเดสจาก *Bacillus stearothermophilus* BR388 เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α พบว่าเอนไซม์ที่แสดงออกจากโคลนสามารถสลายอะคริลาไมด์ได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 และความเข้มข้นของอะคริลาไมด์คือ 1 โมลาร์ และเมื่อทำการมิวเตชัน (mutation) เอนไซม์ที่ได้ โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนฮิสทีดีนที่ตำแหน่ง 26 (His26) เป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) พบว่าปริมาณการแสดงออกของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้น 23 เท่า หรืองานวิจัยของ Kin และ Oriel ในปีเดียวกันที่ทำการแยก *Bacillus* sp. BR449 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เอไมเดสและเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเตส (nitrile hydratase) และทำการโคลนเอนไซม์เอไมเดสเข้าสู่ *E. coli* DH5 α และแสดงออกเอนไซม์เอไมเดส พบว่าเอนไซม์มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 38.6 กิโลดาลตัน และแสดงแอกติวิตี้ของเอนไซม์เอไมเดสเท่ากับ 3.2 หน่วยเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขณะที่เอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเตสชนิดบีต้า- (β -nitrile hydratase) และ แอลฟา- (α -nitrile hydratase) มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากับ 26.5 และ 24.5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และแสดงแอกติวิตี้ของเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเตสเท่ากับ 20 หน่วยเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และยังพบว่าเมื่อใช้อะคริลาไมด์เป็นสับสเตรทของเอนไซม์เอไมเดสจะทำให้เอนไซม์แสดงแอกติวิตี้ได้สูงขึ้นเป็น 4.8 หน่วยเอนไซม์ ขณะที่เมื่อใช้อะคริโลไนไตรล์ (acrylonitrile) เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเตส จะทำให้เอนไซม์แสดงแอกติวิตี้ได้เท่ากับ 22 หน่วยเอนไซม์

ในปี ค.ศ. 2006 Ryabchenko และคณะ ทำการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอไมเดสจาก *Rhodococcus rhodochrous* M8 โดยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยการใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่ออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ (peptide) ที่ได้จากการย่อยเอนไซม์เอไมเดสด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และตรวจสอบความสามารถในการไฮโดรไลซิสสับสเตรทในกลุ่มเอไมด์พบว่า เอนไซม์ที่แสดงออกมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นอะลิฟาติกเอไมด์ (aliphatic amide) สายสั้นรวมทั้งอะคริลาไมด์ด้วย แต่ปริมาณของเอนไซม์เอไมเดสที่โคลนได้มีการแสดงออกในระดับที่ไม่สูงกว่าเชื้อดั้งเดิม (wild type) มากนัก ซึ่งในปีเดียวกันนี้ได้มีรายงานวิจัยของ Yoichi Suzuki และ Hiromichi Ohta ถึงความเสถียรที่อุณหภูมิสูงและการคัดเลือกโครงสร้าง

อินแนทไอโอเมอร์ของเอนไซม์เอไมเดสที่ได้จากการคลายตัวอินคลูชันบอดีที่ที่เกิดจากการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอไมเดสของ *Sulfolobus tokodaii* strain 7 ใน *E. coli* BL21(DE3) โดยพบว่ารีคอมบิแนนท์เอไมเดสมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 47 กิโลดาลตัน และสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 37-80 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอช 7.5 เมื่อใช้เบนซาไมด์เป็นสับสเตรท และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ที่แสดงแอกติวิตีของเอนไซม์เอไมเดสเท่ากับ 8.7 หน่วยเอนไซม์ และต่อมา Yang Yue และคณะ (2009) ทำการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอไมเดสจาก *R. erythropolis* เข้าสู่ *Bacillus subtilis* และแสดงออกเอนไซม์เอไมเดสพบว่า เอนไซม์มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 56 กิโลดาลตัน และแสดงแอกติวิตีเท่ากับ 8.7 หน่วยเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 7 โดยที่มิวิจัยได้รายงานว่าหากทำการแสดงออกเอนไซม์เอไมเดสใน *E. coli* BL21 (DE3) จะพบอินคลูชันบอดีเกิดขึ้น

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่า ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอไมเดสและไนโตรลไฮดราเทสหรือไนโตรเลสนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงทางวิวัฒนาการและลำดับกรดอะมิโน รวมทั้งกลไกในการเร่งปฏิกิริยาจึงมีความเป็นไปได้ที่หากทำการดัดแปลงลำดับกรดอะมิโนบางจุดของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอไมเดสด้วยเทคนิคทางวิศวกรรมโปรตีน ก็อาจเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานและความจำเพาะต่อสับสเตรทที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้การสลายอะคริลาไมด์และสารประกอบกลุ่มเอไมด์ด้วยเอนไซม์เอไมเดสนั้นต้องใช้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปของเอนไซม์บริสุทธิ์ ที่มีการเตรียมหลายขั้นตอน หรือหากอยู่ในรูปของเอนไซม์ที่แสดงออกจากโคลนก็ยังไม่มีความมีประสิทธิภาพในการสลายมากเท่าที่ควร ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณการแสดงออกของเอนไซม์ที่ต่ำ และจากข้อเท็จจริงที่ว่าเมื่อเอนไซม์เกิดปฏิกิริยาไปแล้วจะไม่สามารถนำเอนไซม์นั้นกลับมาใช้ซ้ำได้อีก นอกเสียจากจะอยู่ในรูปของเอนไซม์ตรึง ซึ่งจำเป็นต้องใช้ปริมาณเอนไซม์ตั้งต้นในระดับปริมาณที่สูง ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะผลิตเอนไซม์ตรึงรูปศักยภาพสูง สำหรับใช้ในการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนโตรลโดยใช้เทคนิคทางวิศวกรรมโปรตีนดัดแปลงกรดอะมิโนในบริเวณแอกทีฟของเอนไซม์เอไมเดส จาก *E. aerogenes* หรือบริเวณข้างเคียง (Buranasilp & Charoenpanich, 2011; Mangkalad & Charoenpanich, 2011, Suktanarag & Charoenpanich, 2012) และตรึงรูปเอนไซม์ที่ผ่านการดัดแปลงนี้ เพื่อนำมาทดลองใช้ซ้ำสำหรับกระบวนการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนโตรลในระดับห้องปฏิบัติการที่จะขยายไปสู่การประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป โดยในปีที่ 1 ของการวิจัยจะมุ่งเป้าไปที่การโคลนและแสดงออกรีคอมบิแนนท์เอไมเดสในระบบโปรคาริโอต การสร้างแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์และการคาดเดาบริเวณที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาและการจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ เพื่อจะได้นำมาดัดแปลงโครงสร้างเอนไซม์จากระดับยีนในปีที่ 2 ของการวิจัย จนนำมาสู่การสร้างเอนไซม์ตรึงที่มีศักยภาพสูงในการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนโตรลในปีที่ 3 ซึ่งเป็นปีสุดท้ายของการวิจัยต่อไป

2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในปีที่ 2 ของโครงการวิจัย

เนื่องจากการดำเนินการวิจัยในปีที่ 1 ของโครงการวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอไมเดสใน *Enterobacter aerogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ชนิดใหม่ และคาดเดาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เอไมเดสโดยวิธีการสร้างแบบจำลองโครงสร้างคล้ายได้สำเร็จ เมื่อทำการโคลนยีนเอไมเดสและการแสดงออกรีคอมบิแนนท์เอไมเดสที่มี GST ติดอยู่ในเซลล์ให้อาศัย *Escherichia coli* พบเอนไซม์มีการแสดงออกที่มากเกินไปจนจับกันเป็นก้อนตกตะกอนภายในเซลล์ในรูปของอินคลูชันบอดี (inclusion bodies)

โดยการเติมยาปฏิชีวนะร่วมในอาหารเลี้ยงสำหรับการแสดงออก ไม่สามารถลดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ เอโมเดสในรูปแบบของอินคลูชันบอดีในเซลล์ได้ จึงทำให้คณะผู้วิจัยเปลี่ยนแปลงการดำเนินงานวิจัยในปีที่ 2 เป็นการค้นหาแบคทีเรียได้ทะเลที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อนอะคริลาไมด์ ซึ่งเป็นสารประกอบเอไมด์ที่พบการปนเปื้อนบ่อยในพื้นที่การเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ควบคู่ไปกับการพยายามในการโคลนยีนและแสดงออกรีคอมบิแนนท์เอโมเดสจาก *E. aerogenes* ในระบบ *Escherichia coli*

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การโคลนยีนและแสดงออกกรีคอมบิแนนท์เอไมเดสจาก *E. aerogenes* ใน *Escherichia coli*

ความพยายามในการโคลนยีนเอไมเดสจาก *E. aerogenes* อีกครั้งใน *E. coli* จะทำโดยการสังเคราะห์ยีนเอไมเดสขึ้นมาโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอไมเดสของ *E. aerogenes* ที่ได้จากการดำเนินการวิจัยของโครงการในปีที่ 1 แต่จะทำการวิเคราะห์การเลือกใช้โคดอน (codon usage) ให้เหมาะสมกับระบบ *E. coli* (ภาพที่ 4) และรวมยีนที่สังเคราะห์ได้เข้าในบริเวณโคลนของดีเอ็นเอพาหะ pET100/D-Topo (ภาพที่ 5) เพื่อทำการทรานส์ฟอร์มเข้า *E. coli* BL21 และตรวจสอบการแสดงออกด้วยการวิเคราะห์ SDS-PAGE และการติดตามการสลายอะคริลาไมด์โดยเทคนิค HPLC ในสภาวะวิเคราะห์ที่จะกล่าวต่อไปในหัวข้อ 3.3.5

Name of the gene **Amidase_Eaerogenes**
optimized for **Escherichia coli**

```

                                NcoI
GGATCTGTAAGAAGTACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCATGGATGCTCCGGCAAATCT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTAGACATGCTGCTACTGCTATTCTCCTAGTAGGGAAAGTGGTACCTACCGAGCCGTTTAGA
                                M D G P A N L

                                PvuII
GGGTCATTTTGATCGTCAGCTGGAAGAAGTTAGCGGTGCGGATATTATTGTTCTGCCGGA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGAGTAAACCTAGCAGTCGACCTTCTTCAATCGCCAGCGCTATAATAACAAGACGGCCT
R H F D R Q L E E V S G R D I I V L P E

                                AgeI                                SphI
AATGTTTACCCACCGGTTTTCGCAATGGAAGCAGCAAAAACAGAGCATGCCGAGGGTGAAGT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTACAAATGGTGCCAAAACGTTACCTTGTGCGTTTGTCTCGTACGGCGTCCCACTTCA
M F T T G F A M E A A K Q S M P Q G E V

                                BspMI
TGTTGAATGGATGCTGGCAAAAAGCAGAAACAGACCAATGCAATGATTGCAAGTAGCGCAGC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAACITACCTACGACCGTTTTCGTCCTGTCTGGTTACTAAGTCCATCGCGTCG
V E W M L A K A E Q T N A M I A G S A A

                                PstI
ACTGCAGACCGAACGTTGGTCGGTTAATCGTTTCTGCTGGTTGAACCGGGTGGCAAAAT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGAAGTCTGGCTTGACCCAGGCCAATTAGCAAAAGACGACCACTTGGCCACCGTTTGA
L Q T E R G P V N R F L L V E P G G K M

                                BspM
GCACITTTATGATAAACGTCACCTGTTTGTATGGCGATGAACATCATCATTATGAAGC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTGAAAATACTAATTTGCAAGTGGCAAAAGCATAACCGGCTACTTGTAGTAGTAATACTTCG
H F Y D K R H L F R M A D E H H H Y E A

                                BspM
AGGTACAGAACGTTGTTTGTGATGGGTTGGCGTATTCTGCGCTGGTTTGTGTA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCATGTCTTGACAAACAAAACCTTACCGCACCAACCGCATAAGACGGCGACCAAAACAAAT
G T E R V V F E W R G W R I L P L V C Y

                                NdeI                                BspMI
TGATCTGCGTTTTCCGGTTTGGAGCCGTAATCACAATGATTATGACCTGGCAGCTGTATGT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTAGACGCAAAAGGCCAAACCTCGGCATTAGTGTACTAATACTGGACCGTGACATACA
D L R F P V W S R N H N D Y D L A L Y V

                                BspMI
TGCAAAATGGCGCTGCACCGGTAGCTGCTGATTGCGAGAGCGCTGGTAGCACGTCAAT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGTTTAAACGGACGTGGCGCATCGGACGTAACCGTCTCGGACGACCATCGTGACAGTTA
A N W P A P R S L H W Q S L L V A R A I

                                NdeI                                BspMI
TGAAAATCAGGCATATGTTGCAAGTTGTAATCGTGTGGCCACCGATGGTAATGGCCATCA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTTTTAGTCCGTATACAAACGTTCAACATTAGCACAACCGTGGCTACCAATTACCGTAGT
E N Q A Y V A G C N R V G T D G N G H H

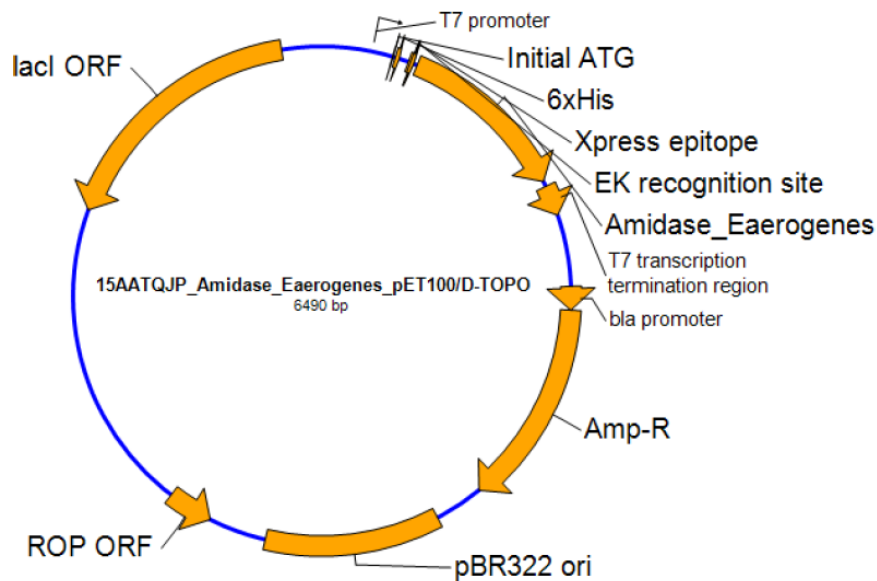
                                BspMI
TTATCGTGGTGTAGCCGTATTATTAGTCCGAGGGCGAAATATTGCAACCGCAGAAACC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATAGCACCACTATCGGCATAAATAACAGGCGTCCCGCTTTAATAACGTTGGCGTCTGG
Y R G D S R I I S P Q G E I I A T A E P

                                BglII
GCATCAGGCAACCGCTCTGGATGCAGATCTGAGCCTGGCAGCCCTGCAAGAATATCGTGA
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTAGTCCGTTGGGCAGACCTAGTCTAGACTCGGACCGTCCGGACGTTCTTATAGCACT
H Q A T R L D A D L S L A A L Q E Y R E

                                SacI
AAAATTTCTGCATGGCAGGATGCCGATCCGTTTACCATTGGTTAAAAGGGCGAGCTCAA
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTAAAGGACGTACCGTCTCTACGGCTAGGCAATGGTAACCAATTTTCCCGCTCGAGTT
K F P A W Q D A D P F T I G *

                                BspMI
CGATCCGCTGCTAACAAGCCCGAA
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTT
```

ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอไมเดสให้เหมาะกับการเลือกใช้โคดอนของ *E. coli*



ภาพที่ 5 แผนที่ตัดจำเพาะของ pET100/D-Topo ที่บรรจุยีนเอไมเดสของ *E. aerogenes* ในบริเวณโคลน

การวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เอไมเดสดำเนินการดังนี้คือ นำ *E. coli* BL21 ที่ได้รับและไม่ได้รีคอมบิแนนท์พลาสติกมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีและไม่มีสารเติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในอาหารเหลว ตามลำดับ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการถ่ายเชื้อเจริญ ความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงในอาหารเหลว LB ใหม่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อในสภาวะเดิมจนค่า OD600 อยู่ในช่วง 0.6-1.0 แล้วทำการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์เอไมเดสโดยการเติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหารและเลี้ยงต่อในสภาวะเดิมเป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเก็บตะกอนของเซลล์เจริญที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ไปละลายอีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) ที่ระดับกำลังไม่เกิน 30 แอมป์ลิทูด เป็นเวลา 10 นาที โดยเปิดคลื่นเสียง 10 วินาที พักเครื่อง 10 วินาที (pulse on/off) และทำบนน้ำแข็งตลอดเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) และตะกอนเซลล์ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตก (cell pellet) มาตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์เอไมเดสจากแถบโปรตีนขนาดประมาณ 26 กิโลดาลตัน ที่เกิดจากการคาตเตาขนาดโปรตีนจากจำนวนกรดอะมิโนของยีนเอไมเดส การวิเคราะห์ SDS-PAGE จะใช้เจลแยก (separating gel) ที่มีความเข้มข้นของอะครีลาไมด์เท่ากับ 15% และมีความเข้มข้นของอะครีลาไมด์ในเจลเริ่ม (stacking gel) เท่ากับ 4% การวิเคราะห์ทำโดยการผสมตัวอย่างสารละลายโปรตีนกับสีระบุตำแหน่ง (dye) ในอัตราส่วน 1:5 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะหยอดลงในช่องของเจล ให้กระแสไฟฟ้าผ่านคงที่ 60

มิลลิแอมแปร์ต่อเจล เมื่อสีระบุตำแหน่งเคลื่อนที่ถึงปลายเจล นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสีคูแมซีบลู (10% กรดอะซิติก 40% เมทานอล และ 0.25% โคโรแมซีบลู) เป็นเวลา 30 นาที และล้างสีที่ไม่ติดกับแถบโปรตีนออกด้วยสารละลายผสมของ 10% กรดอะซิติก และ 40% เมทานอล จนกระทั่งพื้นหลังของเจลไม่มีสี และนำเจลที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยกล้องดิจิตอลต่อไป

3.2 การค้นหาแบคทีเรียใต้ทะเลที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อนอะคริลาไมด์

3.2.1 ตัวอย่างตะกอนทะเลที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างตะกอนทะเลที่นำมาศึกษาเก็บมาจากทะเลในอ่าวไทยในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงกันยายน พ.ศ. 2557 โดยสุ่มเก็บตัวอย่างตะกอนทะเลปริมาณ 10 กรัม จากบริเวณต่างๆ ในอ่าวไทย จำนวน 10 ตัวอย่างที่ระดับความลึกต่างกัน ดังสรุปในตารางที่ 1 ทุกตัวอย่างจะใช้หลอดดูดจากผิวตะกอนทะเลลึกลงไป 10 เซนติเมตร และเก็บในหลอดกันแผลมขนาดความจุ 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ก่อนนำมาวิเคราะห์ ในขณะที่เก็บตัวอย่างจะทำการตรวจวัดอุณหภูมิของน้ำทะเลและความดันน้ำขณะเก็บด้วย

ตารางที่ 1 ตำแหน่งและความลึกของตะกอนทะเลที่ทำการเก็บตัวอย่างมาศึกษา

ตัวอย่างที่	สถานที่	ความลึก (เมตร)	อุณหภูมิน้ำ (°C)	ความดันน้ำ (atm)
1	อ่าวพร้าว จังหวัดระยอง	5	32	1.6
2	เกาะจาน แสมสาร จังหวัดชลบุรี	9	21	2.1
3	เกาะจาน แสมสาร จังหวัดชลบุรี	18	21	3.3
4	เกาะจาน แสมสาร จังหวัดชลบุรี	24	21	4
5	เกาะช้าง จังหวัดตราด	18	24	3.3
6	บ้านกรูด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	0.5	31	1.0
7	เกาะเต่า จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	0.5	34	1.0
8	หินเพิง จังหวัดระยอง	16	26	3
9	หินเพิง จังหวัดระยอง	21	26	3.6
10	เรือหลวงคราม จังหวัดชลบุรี	22	25	3.8

3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเลที่สลายอะคริลาไมด์

ทำการเจือจางตัวอย่างตะกอนทะเลที่เก็บได้แบบอนุกรมจาก 10^{-1} ถึง 10^{-8} ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นนำส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตรมาใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อคัดแยกแบคทีเรียใต้ทะเลที่สามารถสลายอะคริลาไมด์ โดยการเลี้ยงบำรุงในอาหารทะเลมารีน (marine broth) ที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งพลังงานเดียว เลี้ยงบำรุงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นำหลอดทดลองที่ปรากฏความขุ่นของอาหารเลี้ยงมาคัดแยกเชื้ออีกครั้งด้วยการเลี้ยงบำรุงจำนวน 7 ครั้งที่สภาวะเดิม เลือกตัวอย่างที่ทำให้อาหารเหลวขุ่นเมื่อตรวจสอบ

ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ในช่วง 0.6-1.0 มาทำการตัดแยกโคโลนีของเชื้อด้วยการกระจายเซลล์บนอาหารแข็งมารีน (marine agar) ที่มีอะครีลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำบริสุทธิ์โคโลนีของแบคทีเรียที่ขึ้นด้วยการเชื้อเชื้อซ้ำบนอาหารแข็งในสภาวะเดิม เลือกโคโลนีที่พบอัตราการเจริญบนอาหารแข็งที่มีอะครีลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดีที่สุดมาทดสอบความสามารถในการสลายอะครีลาไมด์ต่อไป โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์

3.2.3 การระบุชนิดของแบคทีเรีย

การระบุชนิดของแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้จะใช้ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธี “API Skills Bacterial Identification Method” ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA (Weisburg et al., 1991) ดำเนินการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนอนุรักษ์ 16S rRNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16SRNA ที่เบสตำแหน่ง 22 ถึง 41 และ 1066 ถึง 1085 ของชิ้นยีน 16S rRNA ของ *Escherichia coli* (Precigou et al., 2004) โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ที่เตรียมจากการสกัดด้วยชุด GF-1 Nucleic acid extraction kit เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ดำเนินการทำพีซีอาร์ในสภาวะก่อนการแยกสายดีเอ็นเอ (initial denaturation step) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยรอบการทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบที่ประกอบด้วย ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation step) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing step) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และขั้นตอนการต่อสายดีเอ็นเอ (extension step) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที สุดท้ายทำการต่อสายดีเอ็นเอที่เหลือ (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ (ขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส) ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล (GF-1 Gel DNA recovery kit) และนำไปเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pTG19-T ที่มีปลายโอลิโกไทมีน จากนั้นทรานส์ฟอร์ม (transformation) เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *Escherichia coli* DH5 α สกัดพลาสมิดที่ได้จากทรานส์ฟอร์มแมนท์ (transformants) ด้วยชุดสกัดพลาสมิด GF-1 Plasmid DNA extraction kit และใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป (Sanger et al., 1977) ทำการตรวจสอบความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้ด้วยการวิเคราะห์ BLAST ในฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์อีกครั้งกับ Ez-Taxon database (Chun et al., 2007) จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม SILVA aligner (Pruesse et al., 2007) เพื่อนำมาสร้างแผนภาพต้นไม้แสดงวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) คำนวณความต่างของวิวัฒนาการด้วย Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980) ที่อยู่ในโปรแกรม MEGA 6 software (Tamura et al., 2011) และสร้างแผนภาพต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการแบบ neighbor-joining ด้วยการวิเคราะห์ฐานราก (bootstrap analysis) จำนวน 1000 ซ้ำ (Saitou and Nei, 1987) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้ฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยเลข accession KM370129

3.2.4 การศึกษาลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้

การเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองจะทำเหมือนกันคือเติมหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวเกลือต่ำ W-minimum medium (Kimbara et al., 1989) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ใส่หรือไม่ใส่อะครีลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อจะใช้

อุณหภูมิในช่วง 10-50 องศาเซลเซียส ด้วยการเว้นระยะห่างของอุณหภูมิที่ศึกษาทีละ 5 องศาเซลเซียส ยกเว้นทำการทดลองเพิ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการเจริญของเชื้อจะใช้ค่าพีเอชระหว่าง 3 ถึง 10 ขณะที่การศึกษาผลของความเข้มข้นอะคริลาไมด์ต่อการเจริญจะใช้ความเข้มข้นอะคริลาไมด์ตั้งแต่ร้อยละ 0.05 ถึงร้อยละ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเว้นระยะห่างของความเข้มข้นที่ใช้ศึกษาเป็น ร้อยละ 0.25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ยกเว้นที่ความเข้มข้นแรกที่ทำการศึกษาและที่ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียได้ทะเลที่ทำการศึกษาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรที่เพิ่มขึ้น หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งและรายงานผลการทดลองในรูปของค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2.5 การติดตามความสามารถในการสลายอะคริลาไมด์ของแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้

ติดตามการสลายอะคริลาไมด์โดยแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้ด้วยการเก็บตัวอย่างเชื้อเจริญทุกๆ 3 ชั่วโมง นำมานับจำนวนโคโลนีและแสดงผลในรูปของค่า colony-forming units (CFU) ต่อมิลลิลิตร สำหรับการติดตามการเกิดขึ้นของแอมโมเนียม NH_4^+ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมที่เกิดจากการสลายอะคริลาไมด์จะใช้วิธีของ Phenate (APHA et al., 1985) และแสดงอัตราการผลิตแอมโมเนียมในหน่วยของ $\text{mg-NH}_3/\text{L}$ ซึ่งได้จากการคำนวณเทียบอัตราส่วนของแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงและปริมาตรของเซลล์ การติดตามการสลายอะคริลาไมด์จากปริมาณของอะคริลาไมด์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลงและปริมาณของกรดอะคริลิกที่เพิ่มขึ้นจะทำการทดลองโดยนำตัวอย่างเชื้อเจริญที่เวลาต่างๆ มากรองด้วยไนลอนเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ก่อนที่จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC ที่ใช้ตัวติดตามคือค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยกำหนดปริมาตรการฉีดตัวอย่างครั้งละ 20 ไมโครลิตร และวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ $\mu\text{Bondapak C18}$ (reverse phase) ขนาด 3.9 มิลลิเมตร x 300 มิลลิเมตร (10 ไมโครเมตร 125 อังสตรอม) ที่ใช้ Nova-Pak C18 (4 ไมโครเมตร 60 อังสตรอม) เป็น guard pak ใช้ mobile phase คือสารผสมของ acetonitrile (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตร) และ methanol (ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการแยกสารที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่ออนาที ประมาณความเข้มข้นของตัวอย่างที่วิเคราะห์จากการเทียบพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างกับของพีคมาตรฐานอะคริลาไมด์และกรดอะคริลิก คำนวณเป็นอัตราการสลาย ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การโคลนยีนและแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เอไมเดสจาก *E. aerogenes* ใน *Escherichia coli*

เมื่อทำการสังเคราะห์ยีนเอไมเดสโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอไมเดสของ *E. aerogenes* ที่ได้จากการดำเนินการวิจัยของโครงการในปีที่ 1 แต่ทำการวิเคราะห์การเลือกใช้โคดอน (codon usage) ให้เหมาะสมกับระบบ *E. coli* และรวมยีนที่สังเคราะห์ได้เข้าในบริเวณโคลนของดีเอ็นเอพาหะ pET100/D-Topo เพื่อทำการทรานส์ฟอร์มเข้า *E. coli* BL21 เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เอไมเดสด้วยการวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า ยังคงเกิดการแสดงออกที่มากเกินไปจนจับตัวเป็นก้อนโปรตีนตกตะกอนภายในเซลล์ในรูปของอินคลูชันบอดี (ภาพที่ 6) และไม่สามารถตรวจพบแอกทิวิตีของรีคอมบิแนนท์เอไมเดสในการสลายอะคริลาไมด์ได้ เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายโดยเทคนิค HPLC และวิธีของ Phenate

4.2 การคัดแยกและระบุชนิดแบคทีเรียได้ทะเลที่สามารถสลายอะคริลาไมด์

การคัดแยกแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ด้วยการเลี้ยงบารุงที่ใช้ตะกอนทะเลเป็นหัวเชื้อพบแบคทีเรียที่สามารถเจริญและแสดงความชุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อด่ำที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งพลังงานเดียว จำนวนทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท โดยมีเพียงไอโซเลทเดียวที่ให้อัตราการเจริญสูงสุด ซึ่งได้จากการคัดแยกจากตะกอนทะเลที่เก็บมาจากเกาะจาง แซมสาร ที่ความลึก 18 เมตร เมื่อทำการระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับปฏิกิริยาของกลีเซอรอล (glycerol) อะไมดาลิน (amygdalin) อาร์บูทิน (arbutin) เอสคูลิน เฟอริก ซิเตรท (esculin ferric citrate) ซาลิซิน (salicin) และโพแทสเซียมกลูโคเนต (potassium gluconate) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์น้ำตาลได้หลายชนิด ได้แก่ ดี-ไรโบส (D-ribose), ดี-กลูโคส (D-glucose), ดี-ฟรุคโตส (D-fructose), ดี-แมนโนส (D-mannose), เอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine), ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose), ดี-มอลโตส (D-maltose), ดี-แซคคาโรส (D-saccharose) หรือซูโคส (sucrose), ดี-ทรีฮาโลส (D-trehalose), แป้งและไกลโคเจน (glycogen) แต่ไม่สามารถใช้ดี-อะราไบโนส (D-arabinose) และแอล-อะราไบโนส (L-arabinose), ดี-ไซโลส (D-xylose) และแอล-ไซโลส (L-xylose), ดี-อะราบิทอล (D-arabitol) และแอล-อะราบิทอล (L-arabitol), ดี-อะโดนิทอล (D-adonitol), ดี-กาแลคโตส (D-galactose), แอล-ซอร์โบส (L-sorbose), แอล-รามโนส (L-rhamnose), ดี-แมนนิทอล (D-mannitol), ดี-ซอร์บิทอล (D-sorbitol), ดี-แลคโตส (D-lactose), ดี-เมลิไบโอส (D-melibiose) รวมทั้งให้ผลการทดสอบเป็นลบกับอิริทริทอล (erythritol), เมทิล-บีต้า-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (methyl- β -D-xylopyranoside), ดูซิทอล (ducitol), อินอซิทอล (inositol), เมทิล-แอลฟา-ดี-แมนโนไพราโนไซด์ (methyl- α -D-manno pyranoside), เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (methyl- α -D-glucopyranoside), อินูลิน (inulin), ดี-เมลซิ-

โทส (D-melezitose), ดี-แรฟฟิโนส (D-raffinose), ไซลิตอล (xylitol), เจนทีโอไบโอส (gentiobiose), ดี-ทูรานอส (D-turanose), ดี-ไลโซส (D-lyxose), ดี-ทากาโลส (D-tagalose), ดี-ฟูโคส (D-fucose), แอล-ฟูโคส (L-fucose), โพแทสเซียม 2-คีโตกลูโคเนต (potassium 2-ketogluconate) และ โพแทสเซียม 5-คีโตกลูโคเนต (potassium 5-ketogluconate) ซึ่งจากผลการทดสอบสามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้เป็น *Bacillus cereus* ด้วยระดับความน่าจะเป็นเท่ากับร้อยละ 99.8



ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เอโมเดสจาก *E. aerogenes* ใน *E. coli* BL21

ช่อง M คือ สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

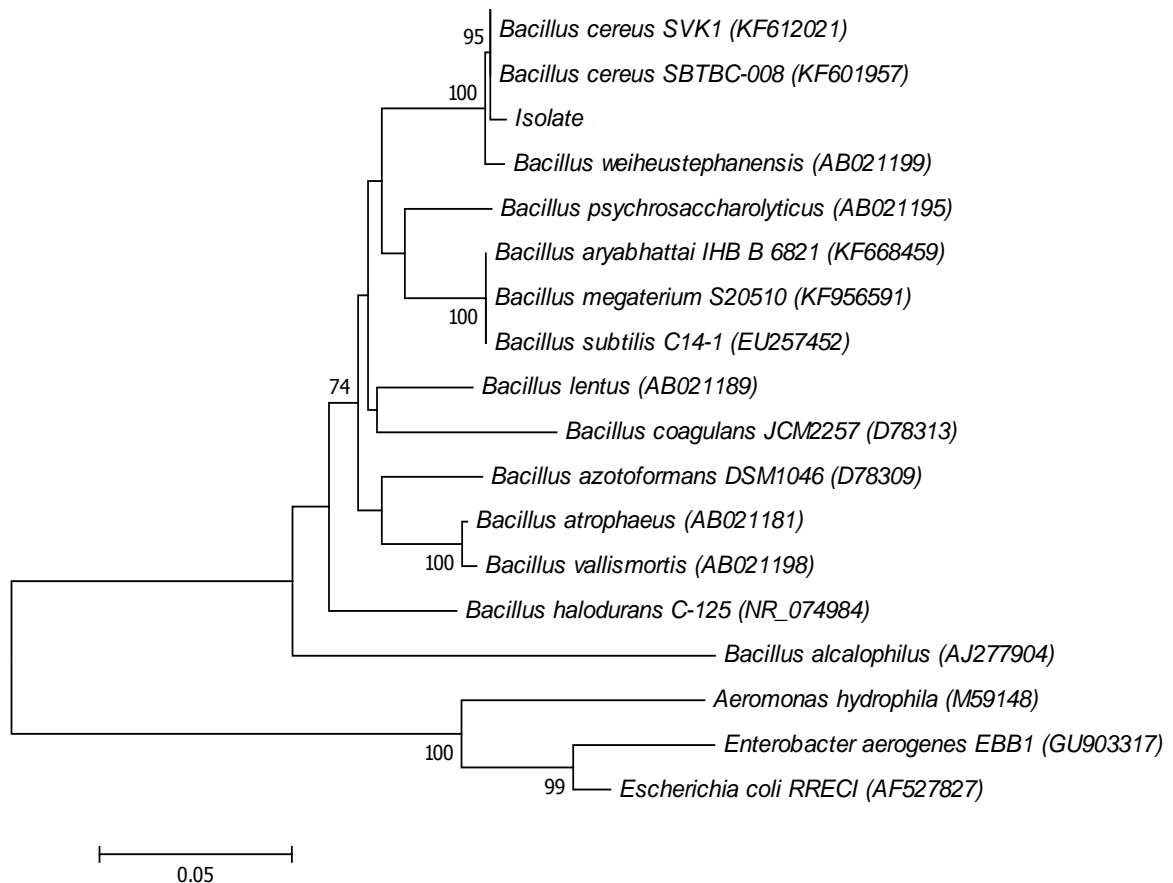
ช่อง 1 และ 2 คือ ส่วนใสที่เกิดจากการทำลายเซลล์ *E. coli* BL21 ที่บรรจุรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เมื่อเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และไม่มีการเหนี่ยวนำ ตามลำดับ

ช่อง 3 และ 4 คือ ส่วนใสที่เกิดจากการทำลายเซลล์ *E. coli* BL21 เมื่อเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และไม่มีการเหนี่ยวนำ ตามลำดับ

ช่อง 5 และ 6 คือ เศษเซลล์ที่ได้จากการทำลายเซลล์ *E. coli* BL21 ที่บรรจุรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เมื่อเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และไม่มีการเหนี่ยวนำ ตามลำดับ

ช่อง 7 และ 8 คือ เศษเซลล์ที่ได้จากการทำลายเซลล์ *E. coli* BL21 เมื่อเหนี่ยวนำการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และไม่มีการเหนี่ยวนำ ตามลำดับ

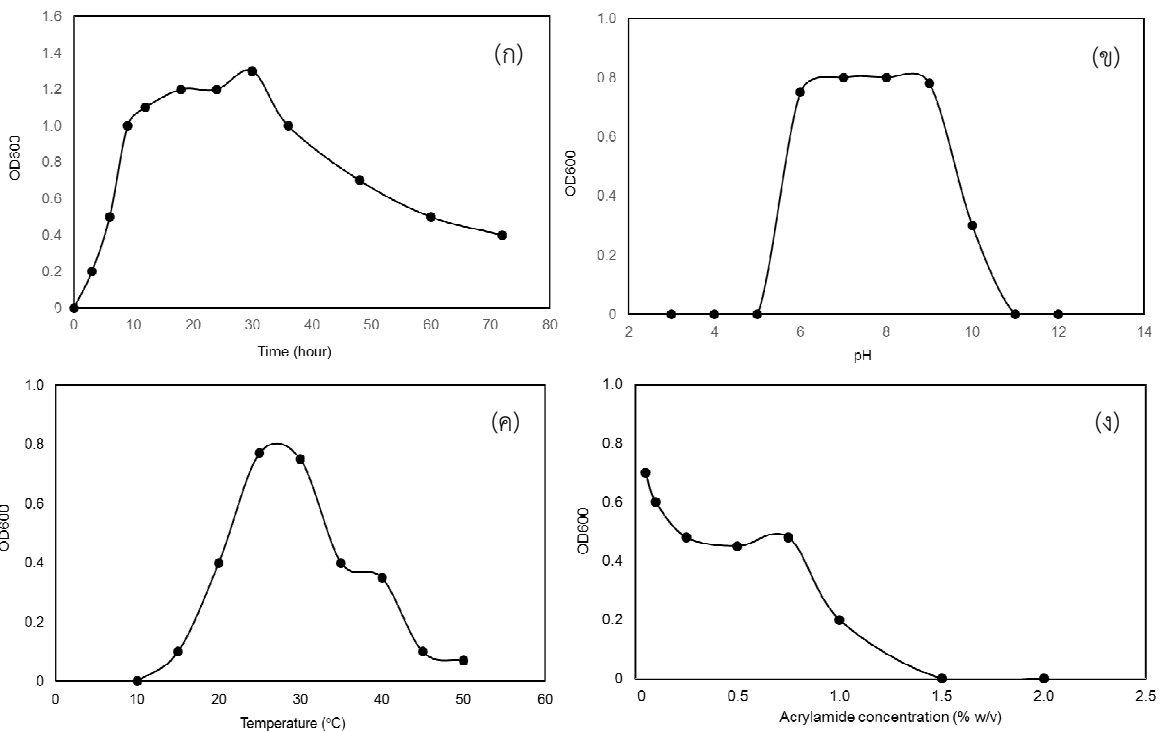
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอนุรักษ์ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบความคล้ายคลึงสูงถึงร้อยละ 99 กับ *Bacillus cereus* หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus* VITPRS (เลข accession KP006600), *B. cereus* SVK1 (เลข accession KF612021), *B. cereus* SBTBC008 (เลข accession KF601957), *B. cereus* L-3 (เลข accession KJ572277), *B. cereus* 03BB102 (เลข accession CP009318), และ *B. cereus* IHB B6826 (เลข accession KF668460) และยังพบความเหมือนที่ระดับเดียวกัน (ความเหมือนร้อยละ 99) กับ *Bacillus* อีกหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus* sp. CH-L11 (เลข accession KP325097), *Bacillus* sp. BAB-3813 (เลข accession KJ832082), และ *Bacillus* sp. B-13 (เลข accession KF479603) เมื่อวิเคราะห์ความใกล้เคียงทางวงศาวิวัฒนาการและสร้างเป็นแผนภาพต้นไม้แบบ neighbor-joining พบว่าแบคทีเรียที่เรี่ยได้ทะเลที่คัดแยกได้อยู่ในกลุ่มของ *B. cereus* (ภาพที่ 7) เมื่อรวมผลวิเคราะห์กับคุณสมบัติทางชีวเคมีจึงสามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้เป็น *B. cereus*



ภาพที่ 7 แผนภาพวงศาวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของ *Bacillus* sp. เทียบกับแบคทีเรียที่เรี่ยที่คัดแยกได้ ตัวเลขที่จุดแตกกิ่งคือระดับความเชื่อมั่นซึ่งแสดงออกเป็นร้อยละและจะแสดงเฉพาะที่มีค่าสูงกว่าร้อยละ 70 เมื่อทำการวิเคราะห์ฐานรากจำนวน 1000 ซ้ำ คำนวณความห่างของวิวัฒนาการโดยใช้วิธี Kimura 2-parameter และแสดงในหน่วยของเบสต่อจุดที่พบความแตกต่าง

4.3 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้

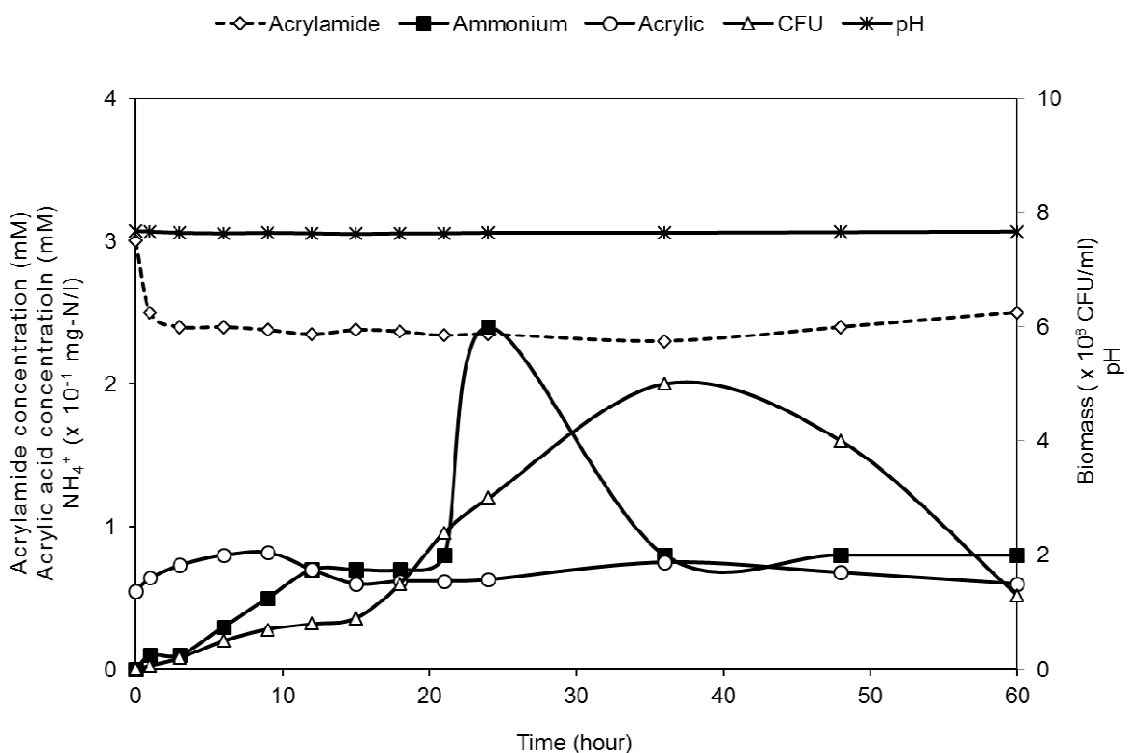
เมื่อติดตามการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *B. cereus* เจริญได้อย่างรวดเร็วและเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) เมื่อทำการเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง และมีอัตราการเจริญที่คงที่นานถึง 30 ชั่วโมง โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงตลอดการศึกษา หลังจากนั้นอัตราการเจริญของเชื้อก็จะลดลง (ภาพที่ 8ก) แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอชระหว่าง 6.0 ถึง 10.0 โดยเจริญได้ดีที่ค่าพีเอช 6.0-9.0 (ภาพที่ 8ข) แต่เมื่อค่าพีเอชต่ำกว่า 5.0 หรือสูงกว่า 10.0 นั้นแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียจะอยู่ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 8ค) และพบการเจริญลดลงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในอาหารเลี้ยงพบว่า ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ที่สูงขึ้นจะส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย และแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังแสดงในภาพที่ 8ง



ภาพที่ 8 (ก) การติดตามการเจริญของ *B. cereus* ในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 และมีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งพลังงานเดียว (ข) ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยง (ค) อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง และ (ง) อัตราการเจริญในสภาวะที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นต่างกัน

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพในการสลายอะคริลาไมด์ของแบคทีเรียได้ทะเลที่คัดแยกได้

เมื่อติดตามการสลายอะคริลาไมด์ของ *B. cereus* จากการติดตามผลิตภัณฑ์อะคริลิกและแอมโมเนียมที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงขณะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีอะคริลาไมด์เป็นแหล่งพลังงานเดียวเป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่า *B. cereus* จะใช้อะคริลาไมด์ในการเจริญและผลิตมวลเซลล์ในลักษณะที่ขึ้นกับเวลาเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 9) โดยตรวจพบอัตราการสลายอะคริลาไมด์สูงสุดที่เวลา 9 ชั่วโมงของการเลี้ยงซึ่งสามารถตรวจพบปริมาณอะคริลิกสูงเท่ากับ 0.82 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นปริมาณของอะคริลิกจะลดลงเล็กน้อย ผลการทดลองแสดงในลักษณะเดียวกันกับปริมาณแอมโมเนียมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมจากการสลายอะคริลาไมด์ที่เกิดขึ้นที่สามารถตรวจพบปริมาณแอมโมเนียมได้สูงที่สุดประมาณ 240 ไมโครกรัมไนโตรเจนของแอมโมเนียต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียมจะลดลง ขณะที่การผลิตมวลชีวภาพของเชื้อขึ้นสูงสุดที่ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงแล้วจึงลดลงอย่างรวดเร็ว พร้อมๆ กับปริมาณอะคริลาไมด์คงเหลือที่คงที่



ภาพที่ 9 การติดตามการสลายอะคริลาไมด์ในอาหารเลี้ยงของ *B. cereus* เมื่อเลี้ยงเจริญเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จากการตรวจสอบการลดลงของอะคริลาไมด์ มวลชีวภาพ การเพิ่มขึ้นของกรดอะคริลิกและแอมโมเนียมที่พบในอาหารเลี้ยง เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญในอาหารเหลวเกลือต่ำ (ค่าพีเอช 7.0) ที่มีแหล่งพลังงานคืออะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

ความสนใจในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สืบเนื่องมาจากการปนเปื้อนของสารเคมีเป็นสิ่งที่กำลังได้รับความนิยมนำไปใช้ในการค้นหากระบวนการควบคุมแบบยั่งยืนที่ไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม การสลายทางชีวภาพเป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้ในการกำจัดสารอินทรีย์ปนเปื้อนที่ไม่พึงประสงค์ให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ไม่สามารถตรวจสอบได้หรือต่ำกว่าค่าอันตรายที่กำหนด แต่ก็ยังมีหลักที่จะต้องพิจารณาคือศักยภาพในการสลายและการค้นหาสิ่งมีชีวิตที่มีประสิทธิภาพที่จะนำมาใช้ในการสลายได้

อะคริลาไมด์เป็นสารเคมีในรูปผลึกของแข็งที่ไม่มีสีไม่มีกลิ่นที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมและมีการผลิตต่อปีสูงถึงประมาณสองแสนตัน (Nagasawa and Yamada, 1989) จากการใช้อย่างแพร่หลายนำมาสู่การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มาจากสองช่องทางหลักคือ จากผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านการปรุงแต่งที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 120 องศาเซลเซียส และเป็นของเสียตกค้างในระดับอุตสาหกรรม (Charoenpanich, 2013) ซึ่งเคยพบรายงานการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ในสิ่งแวดล้อมสูงถึง 200-500 ppm (Charoenpanich, 2013) และเนื่องจากมีรายงานยืนยันว่าอะคริลาไมด์เป็นสารพิษที่ส่งผลต่อระบบประสาทและมีแนวโน้มสูงที่จะเป็นสารก่อมะเร็งในคน การสลายทางชีวภาพของสารอะคริลาไมด์เป็นสารที่มีอันตรายน้อยลงจึงเป็นสิ่งที่กำลังพิจารณาใช้ในการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากสารชนิดนี้ (International Agency for Research on Cancer, 1994)

สิ่งแวดล้อมทางทะเลเป็นแหล่งผลิตจุลินทรีย์ที่มีลักษณะพิเศษในการเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อการดำรงชีวิตและเจริญในสภาวะสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งกำลังได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเคยมีรายงานถึงการใช้อนุพันธ์สารอินทรีย์หลายชนิดโดยจุลินทรีย์ในทะเล แต่ทั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานถึงการสลายสารพิษจากจุลินทรีย์ในทะเล ในโครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ค้นพบ *Bacillus cereus* ซึ่งแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ชนิดใหม่ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลจากเกาะจานแสมสาร ที่ระดับความลึก 18 เมตร

การติดตามการเจริญของ *B. cereus* ในสภาวะที่มีอะคริลาไมด์พบว่า *B. cereus* สามารถใช้อะคริลาไมด์เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญและผลิตมวลชีวภาพ โดยสามารถเจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 6.0-9.0 ซึ่งให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันกับการเจริญของแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้า ยกตัวอย่างเช่น *Rhodococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. MCI3434 ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเท่ากับ 7.0 (Nawaz et al., 1998) หรือ *Bacillus cereus* DRY135 ที่เจริญได้ดีในค่าพีเอช 6.0-7.0 (Shukor et al., 2009) ซึ่งเหมือนกับของ *Kluyvera georgiana* (Thanyachoen et al., 2012) หรือค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Enterobacter aerogenes* ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 (Buranasilp and Charoenpanich, 2011) เป็นต้น สำหรับการที่ *B. cereus* ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอชน้อยกว่า 5.0 หรือมากกว่า 10.0 นั้น อาจเนื่องมาจากที่ค่าพีเอชนี้ไปลดความเสถียรของพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เมมเบรนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งก็ได้ (Booth, 1985) สำหรับการชอบเจริญในสภาวะอุณหภูมิ 25 และ

30 องค์เซลล์เชื้อของ *B. cereus* นี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรียไต้ทะเลชนิดนี้ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำทิ้งได้ (Charoenpanich, 2013) การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นอะคริลาไมด์ที่ส่งผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อนั้นอาจเนื่องมาจากผลของอะคริลาไมด์ที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่มีหมู่ไทออล (thiol) (Cavins and Friedman, 1968) ซึ่งเคยมีการรายงานในลักษณะเดียวกันก่อนหน้านี้ว่าความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ประมาณร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ได้ (Shukor et al., 2009; Wang and Lee, 2001)

เมื่อติดตามการสลายของอะคริลาไมด์แล้วพบว่า *B. cereus* สามารถใช้อะคริลาไมด์เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญ เพิ่มจำนวนมวลชีวภาพ และผลิตกรดอะคริลิกและแอมโมเนียออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ตรวจสอบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองที่ได้บ่งบอกถึงกระบวนการสลายอะคริลาไมด์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดขึ้นจริง และการลดลงของปริมาณกรดอะคริลิกภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 9 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากเกิดการสลายต่อของกรดอะคริลิกภายในเซลล์เป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่มีความเป็นพิษน้อยกว่า (Charoenpanich, 2013) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า *B. cereus* ใช้อะคริลาไมด์เป็นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นในการเจริญ จนเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่จะใช้ผลิตภัณฑ์กรดอะคริลิกเป็นแหล่งพลังงานถัดไป ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี quorum sensing ที่เสนอว่าเมื่อความหนาแน่นของเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายอย่างสมบูรณ์ต่อไป (Swift et al., 1996) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจของแบคทีเรียไต้ทะเลที่จะเป็นแหล่งผลิตสิ่งมีชีวิตที่สามารถสลายอะคริลาไมด์แหล่งใหม่ได้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ค้นพบแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ชนิดใหม่ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลจากเกาะจาน แสมสาร ที่ระดับความลึก 18 เมตร และได้ระบุชนิดจากคุณสมบัติทางชีวเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของซันยีน 16S rRNA เป็น *Bacillus cereus* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสภาวะที่มีค่าพีเอชช่วงกว้าง ระหว่าง 6.0-9.0 และอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส โดยสามารถตรวจพบการสลายของอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิกภายหลังการเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และตรวจพบการสลายสูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจของแบคทีเรียได้ทะเลที่จะเป็นแหล่งผลิตสิ่งมีชีวิตที่สามารถสลายอะคริลาไมด์แหล่งใหม่ได้

บรรณานุกรม

- จิตติมา เจริญพานิช. (2551). อะคริลาไมด์ : ก่อตัวได้ง่ายกำจัดไม่ยาก (Acrylamide: its formation and degradation). "Veridian E-Journal Silpakorn University" ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 เดือนกันยายน หน้า 68-79.
- Almatawah Q. A., Cramp R., and Cowan D. A. (1999). Characterization of an inducible nitrilase from a thermophilic bacillus. *Extremophiles*. 3: 283-291.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation). (1985). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16th ed. American Public Health Association, Washington DC.
- Asano, Y., Fujishiro, K., Tani, Y., & Yamada, H. (1982a). Aliphatic nitrile hydratase from *Arthrobacter* sp. J-1 purification and characterization. *Agricultural and Biological and Chemistry*. 46: 1165-1174.
- Asano, Y., Tachibana, M., Tani, Y., & Yamada, H. (1982b). Purification and characterization of amidase which participates in nitrile degradation. *Agricultural and Biological Chemistry*. 46: 1175-1181.
- Babu G. R. V., Wolfram J. H., Marian J. M., & Chapatwala K. D. (1995). *Pseudomonas marginalis*: its degradative capability on organic nitriles and amides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43: 739-745.
- Banerjee, A., Sharma, R., & Banerjee, U. C. (2002). The nitrile- degrading enzyme: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 33-44.
- Barbash, J. E., Thelin, G. P., Kolpin, D. W., & Gilliom R. J. (2001). Major herbicides in ground water: Results from the National Water-Quality Assessment. *Journal of Environmental Quality*. 30: 831-845.
- Barsomian, G. D., Johnson, T. L., Borowski, M., Denman, J., Ollington, J. F., Hirani, S., McNeilly, D.S., & Rasmussen, J. R. (1990). Cloning and expression of peptide-N₄-(N-acetyl- β -D-glucosaminyl) asparagines amidase F in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 265: 6967-6972.
- Banerjee, A., Sharma, R., & Banerjee, U. C. (2002). The nitrile degrading enzymes: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 33-44.
- Booth, I.R. (1985). Regulation of cytoplasm pH in bacteria. *American Society for Microbiology*. 49: 359.
- Boxall, A. B. A., Sinclair, C. J., Fenner, K., Kolpin, D., & Maund, S. J. (2004). When synthetic chemicals degrade in the environment. *Environment Science Technology*. 38: 368-375.

- Brown, L., Rhead M. M., Hill D., & Bancroft K. C. C. (1982). Qualitative and quantitative studies on the insite-adsorption, degradation and toxicity of acrylamide by spiking waters of two sewage works and a river. *Water Research*. 16: 579-591.
- Bui, K., Fradet, H., Arnaud, A., & Galzy, P. (1984). Nitrile hydratase with a wide spectrum produced by a *Brevibacterium* sp. *Journal of General Microbiology*. 130: 89-93.
- Buranasilp, K., & Charoenpanich, J. (2011). Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter aerogenes* isolated from wastewater in Thailand. *Journal of Environmental Sciences*. 23(3): 396-403.
- Cavins, J. F., & M. Friedman. (1968). Specific modification of sulfhydryl groups with β -unsaturated compounds. *Journal of Biological Chemistry*. 243: 3357-3360.
- Charoenpanich, J. (2013). Removal of Acrylamide by Microorganisms. In *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches* (Yogesh B. Patil and Prakash Rao, eds.) InTech Open Access Publishers, Croatia, 99-119.
- Chebrou, H., Bigey, F., Arnaud, A., & Galzy, P. (1996). Study of the amidase signature group. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1298: 285-293.
- Cheong, T. K., & Oriel, P. J. (2000). Cloning of a wide-spectrum amidase from *Bacillus stearothermophilus* BR388 in *Escherichia coli* and marked enhancement of amidase expression using directed evolution. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 152-158.
- Cherry, A. B., Gabaccia, A. F., & Senn, H. W. (1956). The assimilation behaviour of certain toxic organic compounds in natural waters. *Sewage Industrial Water*. 28: 1137.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., & Lim, Y.W. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of System Evolution and Microbiology*. 57: 2259.
- Croll, B. T., Arkell, G. H., & Hodge, R. P. J. (1974). Residues of acrylamide in water. *Water Research*. 8: 989-993.
- Dadd, M. R., Claridge, T. D. W., Walton, R., Pettman, A. J., & Knowles, C. J. (2001). Regioselective biotransformation of the dinitrile compounds 2-, 3- and 4- (cyanomethyl) benzonitrile by the soil bacterium *Rhodococcus rhodochrous* LL 100-21. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 20-27.
- Danner, H., Urmos, M., Gartner, M., & Braun, R. (1998). Biotechnological production of acrylic acid from biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 70: 887-894.
- Dhillon, J. K., & Shivaraman, N. (1999). Biodegradation of cyanide compounds by a *Pseudomonas* species (S1). *Canadian Journal of Microbiology*. 45: 201-208.

- Dias, J. C. T., Rezende, R. P., & Linardi, V. R. (2001). Bioconversion of nitriles by *Candida guilliermondii* CCT 7202 cells immobilized in barium alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 757-761.
- Dias, J. C. T., Rezende, R. P., Rosa, C. A., Lachance, M. A., & Linardi, V. R. (2000). Enzymatic degradation of nitriles by a *Candida guilliermondii* UFMG-Y65. *Canadian Journal of Microbiology*. 46: 525-531.
- DiGeronimo, M. J., & Antoine, A. D. (1976). Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL 100-21. *Applied Environmental Microbiology*. 3: 900-906.
- Dixit, R., Mukhtar, H., Seth, P. K., & Krishna Murti C. R. (1980). Binding of acrylamide with glutathione-s-transferase. *Chemical Biological Interaction*. 32: 353-359.
- Endo, I., Nojiri, M., Tsujimura, M., Nakasako, M., Nagashima, S., Yohda, M., & Odaka, M. (2001). Fe-type nitrile hydratase. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 83: 247-253.
- European Environmental Agency. (1999). Environmental assessment report no. 3. Groundwater quality and quantity in Europe.
- Fallon, R. D., Stieglitz, B., & Turner I. Jr. (1997). A *Pseudomonas putida* capable of stereoselective hydrolysis of nitriles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47: 156-161.
- Fournand, D., & Arnaud, A. (2001). Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 381-393.
- Friedrick, G. C., & Mitrenga, G. (1981). Utilization of aliphatic amides and formation of two different amidases by *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Genetics Microbiology*. 125: 367-374.
- Gao, M., Wang, D. X., Zheng, Q. Y., Huang, Z. T., & Wang, M. X. (2007). Remarkable electronic and steric effects in the nitrile biotransformations for the preparation of enantiopure functionalized carboxylic acids and amides: implication for an unsaturated carbon-carbon bond binding domain of the amidase. *Journal of organic chemistry*. 72: 6060-6066.
- Geological Survey of Denmark and Greenland Bulletin. (2004). The influence of conceptual geological models on the simulation of flow and transport in Quaternary aquifer systems. Geological Survey of Denmark and Greenland Report. 107.
- Goldlust, A. & Bohak, Z. (1989) Induction, purification, and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 11: 581-601.
- Grant, D. J. W., & Wilson, J. (1973). Degradation and hydrolysis of amides by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* NCIB 10803. *Microbios*. 8: 15-22.
- Harper, D. B. (1977a). Fungal degradation of aromatic nitriles: enzymology of C-N cleavage by *Fusarium solani*. *Biochemical Journal*. 167: 685-692.

- Harper, D. B. (1977b). Microbial metabolism of aromatic nitriles. *Biochemical Journal*. 165: 309-319.
- Harper, D. B. (1985). Characterization of a nitrilase from *Nocardia* sp. (*Rhodochrous* group) N.C.I.B. 11215, using p-hydroxybenzoxitrile as sole carbon source. *International Journal of Biochemistry*. 17: 677-683.
- Hirrlinger, B., Stolz, A., & Knackmuss, H.-J. (1996). Purification and properties of an amidase from *Rhodococcus erythropolis* MP50 which enantioselectively hydrolyses 2-aryl-propionamides. *Journal of Bacteriology*. 178: 3501-3507.
- Holtze, M. S., Sorensen, J., Hansen, H. C. B., & Aamand, J. (2006). Transformation of the herbicide 2,6-dichlorobenonitrile to the persistent metabolite 2,6-dichlorobenzamide (BAM) by soil bacteria known to harbor nitrile hydratase or nitrilase. *Biodegradation*. 17: 503-510.
- Hoyle, A. J., Bunch, A. W., & Knowles, C. J. (1998). The nitrilases of *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216. *Enzyme and Microbial Technology*. 23: 475-482.
- Hu, J. G., Wang, Y. J., Zheng, Y. G., & Shen, Y. C. (2007). Isolation of glycolonitrile-hydrolyzing microorganism based on colorimetric reaction. *Enzyme and Microbial Technology*. 41: 244-249.
- Hynes, M. J., & Pateman, J. A. (1970). The use of amides as nitrogen sources by *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*. 63: 317-324.
- IARC. (1994). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 60: 389.
- Kagayama, T., & Ohe, T. (1990). Purification and properties of an aromatic amidase from *Pseudomonas* sp. GDI211. *Agricultural Biological Chemistry*. 54: 2565-2571.
- Kao, C. M., Chen, K. F., Liu, J. K., Chou, S. M., & Chen, S. C. (2006). Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 228-233.
- Kimbara, K., Hashimoto, T., Fukuda, M., Koana, T., Takagi, M., Oishi, M., & Yano, K. (1989). Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2, 3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *Journal of Bacteriology*. 171(5): 2740-2747.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111.
- Kobayashi, M., Fujiwara, Y., Goda, M., Komeda, H. & Shimizu, S. (1997). Identification of active sites in amidase: Evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 94(11): 986-991.
- Kobayashi, M., Nagasawa, T., & Yamada, H. (1989). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1: Purification and Characterization. *European Journal of Biochemistry*. 182: 349-356.

- Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., & Yamada, H. (1990). Purification and characterization of a novel nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* K 22 that acts on aliphatic nitriles. *Journal of Bacteriology*. 172: 4807-4815.
- Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., & Yamada H. (1992). Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue. *Biochemistry*. 31(37): 9000-9007.
- Krieger, E., Nabuurs, S. B., & Vriend, G. (2003). Homology modeling. *Structural Bioinformatics*. ISBN 0-471-20199-5.
- Lande, S. S., Bosch, S. J., & Howard, P. H. (1979). Degradation and leaching of acrylamide in soil. *Journal of Environmental Quality*. 8: 133-137.
- Langdahl, B. R., Bisp, P., & Ingvorse, K. (1996). Nitrile hydrolysis by *Rhodococcus erythropolis* BL1, a acetonitrile-tolerant strain isolated from a marine sediment. *Microbiology*. 142: 145-154.
- Lee, C. M., & Wang, C. C. (2004). Denitrification with epsilon-caprolactam by acclimated mixed culture and by pure culture of bacteria isolated from polyacrylonitrile fibre manufactures wastewater treatment system. *Water Science and Technology*. 49: 341-348.
- Lira, C. T., & McCrackin, P. J. (1993). Conversion of lactic acid to acrylic acid in near-critical water. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 32: 2608-2613.
- Maestracci, M., Bui, K., Thiery, A., Arnud, A., & Galzy, P. (1984). A study of the inhibition of an amidase with a wide substrate spectrum and its consequences for the bioconversion of nitriles. *Biotechnology Letters*. 6: 149-154.
- Mangkalad, O., & Charoenpanich, J. (2011). Gene identification of an amidase from a novel acrylamide-degrading *Enterobacter aerogenes*. In *Proceedings of the 3rd Biochemistry and Molecular Biology (BMB) international conference: From basic to translational researches for a better life*, The Science Society of Thailand, April 6-8, The Empress Convention Centre, Chiangmai, Thailand.
- Mathew, C. D., Nagasawa, T., Kobayashi, M., & Yamada, H. (1988). Nitrilase-catalyzed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Applied Environmental Microbiology*. 54: 1030-1032.
- Mayaux, J. F., Cerbelaud, E., Soubrier, F., Yeh, P., Blanche, F., & Petre, D. (1991). Purification, cloning, and primary structure of a new enantiomer-selective amidase from a *Rhodococcus* strain: structural evidence for a conserved genetic coupling with nitrile hydratase. *Journal Bacteriology*. 173: 6694-6704.

- Nagasawa, T., Takeuchi, K., & Yamada, H. (1988). A novel nitrilase, arylacetonitrilase of *Alcaligenes faecalis* JM3: Purification and characterization. *European Journal of Biochemistry*. 194: 765-772.
- Nagasawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T., & Gekko, K. (2000). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1: Conversion into the active form by subunit association. *European Journal of Biochemistry*. 267: 138-144.
- Nagasawa, T., & Yamada, H. (1989). Microbial transformations of nitriles. *Trends in Biotechnology*. 7: 153-158.
- Nawaz, M. S., Billedeau, S. M., & Cerniglia, C. E. (1998). Influence of selected physical parameters on the biodegradation of acrylamide by immobilized cells of *Rhodococcus* sp. *Biodegradation*. 9: 381-387.
- Nawaz, M. S., Chapatwala, K. D., & Wolfram, J. H. (1989). Degradation of acetonitrile by *Pseudomonas putida*. *Applied Environmental and Microbiology*. 55: 2267- 2274.
- Nawaz, M. S., Davis, J. W., Wolfram, J. H., & Chapatwala, K. D. (1991). Degradation of organic cyanides by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 28: 865-875.
- Nawaz, M. S., Franklin, W., & Cerniglia, C. E. (1993). Degradation of acrylamide by immobilized cells of a *Pseudomonas* sp. and *Xanthomonas maltophilia*. *Canada Journal of Microbiology*. 39: 207-212.
- Nawaz, M. S., Khan, A. A., Bhattacharayya, D., Siitonen, P. H. & Cerniglia, C.E. (1996). Physical, biochemical, and immunological characterization of a thermostable amidase from *Klebsiella pneumonia* NC TR1. *Journal of Bacteriology*. 8: 2397-2401.
- Nawaz, M. S., Khan, A. A., Seng, J. E., Leakey, J. E., Siitonen, P. H., & Cerniglia, C. E. (1994). Purification and characterization of an amidase from an acrylamide-degrading *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3343-3348.
- Novo, C., Farnaud, S., Tata, R., Clemente, A., & Brown, P. R. (2002). Support for a three dimensional structure predicting a Cys-Glu-Lys catalytic triad for *Pseudomonas aeruginosa* amidase comes from site-directed mutagenesis and mutations altering substrate specificity. *Biochemical Journal*. 365: 731-738.
- Novo, C., Tata, R., Clemente, A., & Brown, P. R. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* aliphatic amidase is related to the nitrilase/cyanide hydratase enzyme family and Cys166 is predicted to be the active site nucleophile of the catalytic mechanism. *FEBS Letters*. 367: 275-279.
- Okamoto, S., & Eltis, L. D. (2007). Purification and characterization of a novel nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. RHA1. *Molecular microbiology*. 65: 828-838.

- Pace, H. C., & Brenner, C. (2001). The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology*. 2: 1-9
- Patel, R. N. (2006). Biocatalysis: synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Current in Organic Chemistry*. 10: 1289-1321.
- Pertsovich, S. I., Guranda, D. T., Podchernyaev, D. A., Yanenko, A. S., & Svedas, V. K. (2005). Aliphatic amidase from *Rhodococcus rhodochrous* M8 is related to the nitrilase/cyanide hydratase family. *Biochemistry*. 70: 1280-1287.
- Pollak, P., Romender, G., Hagedorn, F., & Gelbke, H. P. (1991) In: Elvers B., Hawkins S., Schulz G. (eds.) *Ullman's encyclopedia of industrial chemistry*, vol A17, 5th edn. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 363-376.
- Porazzi, E., Pardo Martinez, M., Fanelli, R., & Benfenati, E. (2005). GC-MS analysis of dichlobenil and its metabolites in groundwater. *Talanta*. 68: 146-154.
- Prabu, C. S., & Thatheyus, A. J. (2007). Biodegradation of acrylamide employing free and immobilized cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 30: 69-73.
- Precigou S., Wieserl M., Pommares P., Goulasl P., Duran R. (2004). *Rhodococcus pyridinovorans* MW3, a bacterium producing a nitrile hydratase. *Biotechnology Letters*. 26: 1379-1384.
- Ramkrishna, C., & Desai, J. D. (1993). Bioconversion of acrylonitril to acrylamide by *Arthrobacter* sp. IPCB-3. *Indian Journal of Experimental Biology*. 31: 173-177.
- Reilly, C. O., & Turner, P. D. (2003). The nitrilase family of CN hydrolyzing enzymes-a comparative study. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 1161-1174.
- Ryabchenko, L. E., Podchernyaev, D. A., Kotlova, E. K., & Yanenko, A. S. (2006). Cloning of the amidase gene from *Rhodococcus rhodochrous* M8 and its expression in *Escherichia coli*. *Russian Journal of Genetics*. 42: 886-889.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of National Academic Sciences USA*. 74: 5463-5467.
- Shanker, R., Ramakrishna, C., & Seth, P. K. (1990). Microbial degradation of acrylamide monomer. *Achieved Microbiology*. 154: 192-198.
- Sharma, M., Sharma, N. N., & Bhalla, T. C. (2009). Amidases: versatile enzymes in nature. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 8: 343-366.
- Sheldon, R. A., & van Rantwijk, F. (2004). Biocatalysis for sustainable organic synthesis. *Australian Journal of Chemistry*. 57: 281-289.

- Shukor, M.Y., Gusmanizar, N., Azmi, N.A., Hamid, M., Ramli, J., Shaman, N.A. et al. (2009). Isolation and characterization of an acrylamide-degrading *Bacillus cereus*. *Journal of Environmental Biology*. 30: 57.
- Sinclair, C. J., & Boxall, B. A. (2003). Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation product. *Environmental Science and Technology*. 37(20): 4617-4625.
- Sluis, M. K., Larsen, R. A., Krum, J. G., Anderson, R., Metcalf, W. W., & Ensign, S. A. (2002). Biochemical, molecular, and genetic analysis of the acetone carboxylases from *Xanthobacter autotrophicus* strain Py2 and *Rhodobacter capsulatus* strain B10. *Journal of Bacteriology*. 184: 2969-2977.
- Smith, E. A., Prues, S. L., & Oehme, F. W. (1996). Environmental degradation of polyacrylamides. 1. effects of artificial environmental conditions: temperature, light, and pH. *Ecotoxicological and Environmental Safety*. 35: 121-135.
- Song, L., Wang, M., Shi, J., Xue, Z., Wang, M. X., & Qian, S. (2007). High resolution X-ray molecular structure of the nitrile hydratase from *Rhodococcus erythropolis* AJ270 reveals posttranslational oxidation of two cysteines into sulfinic acids and a novel biocatalytic nitrile hydration mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 362: 319-324.
- Sugai, T., Yamazaki, T., Yokoyama, M., & Ohta, H. (1997). Biocatalysis in organic synthesis. The use of nitrile and amide hydrolyzing microorganisms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 61: 1419-1427.
- Suktanarag, S. & Charoenpanich, J. (2012). Sequence analysis and structural modeling of an amidase from a novel acrylamide-degrading bacterium *Enterobacter aerogenes*. In *Proceedings of the 13th FAOBMB Congress "Discovery of Life Processes: From Biomolecules to Systems Biology, November 25-29, Bangkok, Thailand*.
- Suzuki, Y., & Ohta, H. (2006). Identification of a thermostable and enantioselective amidase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Protein Expression and Purification*. 45: 368-373.
- Swift S., Throup, J.P., Williams, P., Salmond, G.P., & Stewart, G.S. (1996). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends in Biochemical Sciences*. 21: 214.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731.

- Tauber, M. M., Cavaco-Paulo, A., Robra, K. H., & Gubitz, G. M. (2000). Nitrile hydratase and amidase from *Rhodococcus rhodochrous* hydrolyze acrylic fibers and granular polyacrylonitriles. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 1634-1638.
- Thanyacharoen, U., Tani, A., & Charoenpanich, J. (2012). Isolation and characterization of *Kluyvera georgiana* strain with the potential for acrylamide biodegradation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 47: 1491-1499.
- Verschuere, K. (1977). *Handbook of environmental data on organic chemicals*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Versteegh, J. F. M., & te Biesebeek, J. D. (2003). De kwaliteit van het drinkwater in Nederland, in 2001, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, The Netherlands.
- Wampler, D. A., & Ensign, S. A. (2005). Photoheterotrophic metabolism of acrylamide by a newly isolated strain of *Rhodopseudomonas palustris*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 5850-5857.
- Wang, C. C., & Lee, C. M. (2001). Denitrification with acrylamide by pure culture of bacteria isolation from acrylonitrile-butadiene-styrene resin manufactured wastewater treatment system. *Chemosphere*. 44: 1047-1053.
- Wang, C. C., Lee, C. M., & Chen, L. J. (2004). Removal of nitriles from synthetic wastewater by acrylonitrile utilizing bacteria. *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxicology and Substances and Environment Engineering*. 39: 1767-1779.
- Wang, J. Y., Wang, D. X., Pan, J., Huang, Z. T., & Wang, M. X. (2007). Nitrile and amide biotransformations for the synthesis of enantiomerically pure 3-arylaziridine-2-carboxamide derivatives and their stereospecific ring-opening reactions. *Journal of Organic Chemistry*. 72: 9391-9394.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*. 173 (2): 697-703.
- Wolter, R., Rosenbaum, S., & Hannappel, S. (2001). The German groundwater monitoring network. In: Timmermann, J. G., Cofino, W. P., Enderlein, R. E., Jülich, W., Literathy, P. L., Martin, J. M., Ross, Ph., Thyssen, N., Turner, R. K., & Ward, R. D. (Eds.) pp. 277-282. RIZA, Lelstad.
- Yamada, H., Asano, Y., Hing, T., & Tani, Y. (1976). Microbial utilization of acrylonitrile. *Journal of Fermentation Technology*. 5: 8-14.
- Yamada, H., Asano, Y., Hing, T., & Tani, Y. (1980). Microbial utilization of glutaronitrile. *Journal of Fermentation Technology*. 6: 495-500.
- Yamada, H., & Kobayashi, M. (1996). Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 60: 1391-1400.

- Zabaznaya, E. V., Kozulin, S. V., & Voronin, S. P. (1998). Selection of strains transforming acrylonitrile and acrylamide into acrylic acid. *Applied Biochemical Microbiology*. 34: 341-345.
- Zheng, Y. G., Chen, J., Liu, Z. Q., Wu, M. H., Xing, L. Y., & Shen, Y. C. (2008). Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063, a versatile nitrile-converting bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77: 985-993.
- Zheng, R. C., Wang, Y. S., Liu, Z. Q., Xing, L. Y., Zheng, Y. G., & Shen, Y. C. (2007). Isolation and characterization of *Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174, capable of *R*-enantioselective degradation of 2,2-dimethylcyclopropanecarboxamide. *Research Microbiology*. 158: 258-264.