



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอนไซม์ตรึงรูปที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อน
กลุ่มเอไมด์และไนไตรล์

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

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

รหัสโครงการ 176347

สัญญาเลขที่ 27/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอนไซม์ตรึงรูปที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อน

กลุ่มเอไมด์และไนไตรล์

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

รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 176347

สัญญาเลขที่ 27/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอนไซม์ตรึงรูปที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อน
กลุ่มเอไมด์และไนไตรล์

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

รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตเอนไซม์ตรึงรูปที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อนกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์” สำเร็จลงด้วยดีเนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 จากงบประมาณเงินแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2558

บทคัดย่อ

ความต้องการใช้อะคริโลไนไตรล์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารเคมีที่มีแนวโน้มสูงที่จะเป็นสารก่อมะเร็งในคนในปริมาณมากในห้องปฏิบัติการและอุตสาหกรรมนำไปสู่การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งการเปลี่ยนรูปโดยใช้จุลินทรีย์ดูเหมือนว่าจะเป็นการกำจัดสารอะคริโลไนไตรล์วิธีเดียวที่มีประสิทธิภาพสูงและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แต่ยังคงต้องการจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการกำจัด โครงการวิจัยนี้รายงานถึงศักยภาพของแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ *Enterobacter aerogenes* ในการย่อยสลายทางชีวภาพสารอะคริโลไนไตรล์ ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในสถานะที่มีอะคริโลไนไตรล์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยสามารถตรวจพบการสลายอะคริโลไนไตรล์ได้หลังการเลี้ยงเชื้อเจริญเป็นเวลา 30 นาที และเกิดการสลายในปริมาณสูงที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยง ซึ่งพบว่าอะคริโลไนไตรล์จะถูกสลายเป็นอะคริลาไมด์ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนียม ผลการทดสอบที่ได้อาจเนื่องมาจาก *E. aerogenes* มีระบบเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเลสและเอไมเดสที่เกี่ยวข้องกับการสลายทางชีวภาพสารอะคริลาไนไตรล์นั่นเอง

คำสำคัญ อะคริโลไนไตรล์, การสลายทางชีวภาพ, อะคริลาไมด์, *Enterobacter aerogenes*

Abstract

A huge demand for acrylonitrile as a ubiquitous chemical for laboratory and industry led to its environmental presence; however the International Agency for Research on Cancer has classified this compound as a probable human carcinogen. Microbial transformation seems to be the only efficient and environmentally friendly process to decompose this monomer but requires high potent microorganisms. This study reported the potential of an acrylamide-degrading *Enterobacter aerogenes* for acrylonitrile biodegradation. The strain grew well in the presence of acrylonitrile at the concentration of 0.2% (v/v). Degradation of acrylonitrile started after 30 minutes of cultivation and reached maximum at 12 hours. Acrylonitrile was firstly degraded to acrylamide and then the obtained acrylamide was changed to acrylic acid and ammonium. These suggest that *E. aerogenes* might contain nitrile hydratase-amidase system used for acrylonitrile biodegradation.

Keywords: Acrylonitrile, Biodegradation, Acrylamide, *Enterobacter aerogenes*

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
2.1.5 อะคริโลไนไตรล์	23
2.1.6 ความเป็นพิษของอะคริโลไนไตรล์	23
2.1.7 การประยุกต์ใช้อะคริโลไนไตรล์ในกระบวนการอุตสาหกรรม	24
2.1.8 การสลายอะคริโลไนไตรล์โดยจุลินทรีย์	29
2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัย	31
3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	32
3.1 การทดสอบผลของความเข้มข้นอะคริโลไนไตรล์ต่อการเจริญของ <i>E. aerogenes</i>	32
3.2 การติดตามการสลายอะคริโลไนไตรล์ของ <i>E. aerogenes</i>	32
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียโดยวิธีของฟิเนต	33
3.4 การทดสอบความสามารถในการสลายสารกลุ่มไนไตรล์ของ <i>E. aerogenes</i>	33
4 ผลการวิจัย	35
4.1 ผลของความเข้มข้นอะคริโลไนไตรล์ต่อการเจริญของ <i>E. aerogenes</i>	35
4.2 การติดตามการสลายอะคริโลไนไตรล์ของ <i>E. aerogenes</i>	35
4.3 การทดสอบความสามารถในการสลายสารกลุ่มไนไตรล์ของ <i>E. aerogenes</i>	36

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	38
5.1 อภิปรายผลการวิจัย	38
5.2 สรุปผลการวิจัย	39
บรรณานุกรม	40
ภาคผนวก	
1 โครมาโทแกรมของสารผสมอะคริโลไนไตรล์ อะคริลาไมด์ และกรดอะคริลิก เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC	50
2 กราฟมาตรฐานของอะคริโลไนไตรล์	51
3 กราฟมาตรฐานของอะคริลาไมด์	52
4 กราฟมาตรฐานของกรดอะคริลิก	53
5 กราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย	54
6 โครงสร้างทางเคมีของไนไตรล์ที่ใช้ในการศึกษา	55
7 โครมาโทแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรล์โดย <i>Enterobacter aerogenes</i> ที่เวลาต่างๆ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC	57
8 โครมาโทแกรมการสลายสารกลุ่มไนไตรล์โดย <i>Enterobacter aerogenes</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วย เทคนิค HPLC	62
ประวัติและผลงานของผู้วิจัย	69

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณการใช้อะครีโลไนไตรล์จำแนกตามประเภทผลิตภัณฑ์	29
2 ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของ <i>E. aerogenes</i> ที่เจริญในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีอะครีโลไนไตรล์ความเข้มข้นต่างกัน	35
3 การสลายสารกลุ่มไนไตรล์โดย <i>E. aerogenes</i>	36
ผ-1 เวลาที่สารผสมอะครีโลไนไตรล์ อะครีลาไมด์ และกรดอะคริลิก เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC	50

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	วิธีการสลายไนไตรต์โดยเอนไซม์สลายไนไตรต์	11
2	การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เอไมเดส	15
3	การจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์เอไมเดส	17
4	กระบวนการผลิตเส้นใยอะคริลิก	25
5	กระบวนการผลิตเม็ดพลาสติก อะคริโลไนไตรล์ บิวทอะไดอีน สไตรีน	26
6	กระบวนการผลิตน้ำยางสังเคราะห์ NBR	27
7	การประยุกต์ใช้สารอะคริโลไนไตรล์ในอุตสาหกรรมต่างๆ	28
8	การสลายอะคริโลไนไตรต์โดยเอนไซม์ไนไตรล์ไฮโดรเลสและเอไมเดส	30
9	การสลายอะคริโลไนไตรต์โดย <i>E.aerogenes</i> ที่เวลาต่างกัน	37
ผ-1	โครมาโทแกรมของสารผสมอะคริโลไนไตรต์ อะคริลาไมด์ และกรดอะคริลิก เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC	50
ผ-2	กราฟมาตรฐานของอะคริโลไนไตรต์	51
ผ-3	กราฟมาตรฐานของอะคริลาไมด์	52
ผ-4	กราฟมาตรฐานของกรดอะคริลิก	53
ผ-5	กราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย	54
ผ-6	โครมาโทแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i> ที่เวลา 0, 30 และ 60 นาที	57
ผ-7	โครมาโทแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i> ที่เวลา 90 นาที 2, 3 และ 6 ชั่วโมง	58
ผ-8	โครมาโทแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i> ที่เวลา 9, 12, 15 และ 18 ชั่วโมง	59
ผ-9	โครมาโทแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i> ที่เวลา 21, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง	60
ผ-10	โครมาโทแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i> ที่เวลา 60 และ 72 ชั่วโมง	61
ผ-11	โครมาโทแกรมของการสลายอะซีโตไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i>	62
ผ-12	โครมาโทแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i>	63
ผ-13	โครมาโทแกรมของการสลายโพรไพโอไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i>	64
ผ-14	โครมาโทแกรมของการสลายบิวทีโรไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i>	65
ผ-15	โครมาโทแกรมของการสลายกลูตาโรไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i>	66
ผ-16	โครมาโทแกรมของการสลายอะดีโปไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i>	67
ผ-17	โครมาโทแกรมของการสลายเบนโซไนไตรต์โดย <i>E. aerogenes</i>	68

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

%	=	ร้อยละ
EC	=	Enzyme committee
HPLC	=	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (High performance liquid chromatography)
OD	=	Optical density

บทที่ 1

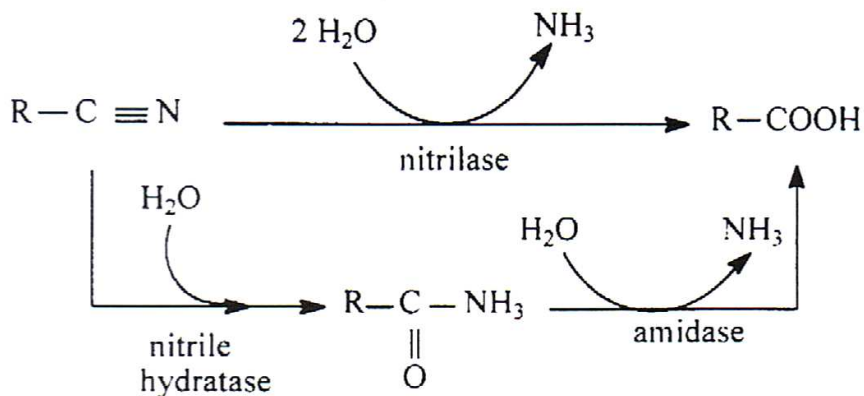
บทนำ

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 โครงสร้างเรซิโอ 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) แบคทีเรียจะสามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นสารประกอบที่มีความมีชีวิตต่ำกว่าได้ นอกจากนี้ *E. aerogenes* ยังสามารถสลายสารกลุ่มเอไมด์และสารอนุพันธ์ได้หลายชนิด ที่คาร์บอนของการเปลี่ยนรูป (% conversion) ต่างกันคือ สามารถสลายบิวทิราไมด์ (butyramide) และยูเรีย (urea) ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่สลายแล็กตาไมด์ (lactamide) ได้ 86% สำหรับความสามารถในการสลายฟอร์มามาไมด์ (formamide) เบนซาไมด์ (benzamide) อะซีตาไมด์ (acetamide) ไฮยาโนอะซีตาไมด์ (cyanoacetamide) และโพรไพโอนาไมด์ (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 เกิดจากการทำงานของเอนไซม์เอไมเดส ในปฏิกิริยาดีอะมีเนชัน (deamination) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ นักวิจัยในห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้ใช้เทคนิคพีซีอาร์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเอไมเดสใน *E. aerogenes* พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนขนาด 726 คู่เบส ที่สามารถคาดเดาเป็นกรดอะมิโนจำนวน 242 ตัว และมีความคล้ายคลึงมากกว่าร้อยละ 80 กับยีนของเอนไซม์ในกลุ่มไนโตรเลส/ไฮยาโนดีไฮโดรเลส 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% กับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไนโตรเลส จาก *Xanthomonas campestris* ซึ่งเป็น เอนไซม์ที่ตัดพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนและไนโตรเจนที่ไม่ใช่พันธะเพปไทด์ ในกลุ่มของเอนไซม์สลายไนโตรล และมีกรดอะมิโนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ กรดอะมิโนกลูตามิก ตำแหน่งที่ 27 (glutamic acid; E27) กรดอะมิโนไลซีน ตำแหน่งที่ 92 (lysine; K92) และกรดอะมิโนซิสเตอีน ตำแหน่งที่ 126 (cysteine; C126) (Mangkalad & Charoenpanich, unpublished data)

ปัจจุบัน ในหลายประเทศมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ หรือเซลล์ตรึงของจุลินทรีย์ (Immobilized cells) ในการสลายสารตกค้างจากกระบวนการอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาไม่นานและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบในภายหลัง 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; 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) แต่ทั้งนี้ ประสิทธิภาพในการสลายสารพิษของจุลินทรีย์ก็ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นความสามารถของจุลินทรีย์ที่

จะดัดแปลงตัวเองให้เจริญในสภาวะแวดล้อมที่ต่างออกไป เช่น ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง สภาวะที่มีความเป็นกรดหรือด่าง สภาวะที่มีโลหะ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารพิษบางชนิดปนเปื้อน และปัญหาในเรื่องของการควบคุมการแพร่กระจายของจุลินทรีย์จากระบบบำบัดลงสู่แหล่งน้ำข้างเคียง ขณะเดียวกันการใช้เอนไซม์ในการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้าก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องต้นทุนการผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ที่จะนำมาใช้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการนำเข้าจากต่างประเทศ รวมทั้งเมื่อสลายด้วยเอนไซม์แล้ว จำเป็นต้องมีกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์กรดอะคริลิกที่ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สิ้นเปลืองเวลา ต้นทุน และพลังงาน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายในตอนต้นที่จะผลิตเอนไซม์ตรึงรูปศักยภาพสูง สำหรับใช้ในการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ดัดแปลงกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เอไมเดส จาก *E. aerogenes* (Buranasilp & Charoenpanich, 2011; Mangkalad & Charoenpanich, 2011, Mangkalad & Charoenpanich, unpublished data) และตรึงรูปเอนไซม์ที่ผ่านการดัดแปลง เพื่อนำมาใช้ซ้ำสำหรับกระบวนการสลายสารกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

จากอุปสรรคในการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์เอไมเดสของ *E. aerogenes* ที่เกิดปัญหาอินคลูชันบอดี้ (inclusion bodies) ที่ทำให้กรีคอมบิแนนท์เอไมเดสจับตัวเป็นก้อนตกตะกอนอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งไม่สามารถแก้ไขได้ แม้จะทำการเปลี่ยนระบบเซลล์ให้อาศัยหรือการโคลนยีนอีกครั้งจากการดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เหมาะสมกับการเลือกใช้โคดอนของ *Escherichia coli* แล้วก็ตามในการดำเนินการวิจัยปีที่ 1 และ 2 ของโครงการวิจัย จึงไม่สามารถทำการตรึงรูปเอนไซม์เอไมเดสต่อได้ ซึ่งในการดำเนินการวิจัยปีที่ 2 คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยนแผนการดำเนินงานวิจัยมาเป็นการค้นหาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสลายสารประกอบกลุ่มเอไมด์และไนไตรล์ เพื่อนำมาใช้ในรูปของเซลล์ตรึงสลายการปนเปื้อนของสารกลุ่มดังกล่าวแทน โดยในปีที่ 2 นี้ ได้มุ่งเน้นที่การค้นหาแบคทีเรียได้ทะเลที่มีศักยภาพในการสลายสารปนเปื้อนอะคริลาไมด์ ซึ่งเป็นสารประกอบเอไมด์ที่พบการปนเปื้อนบ่อยในพื้นที่การเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแล้ว สำหรับการดำเนินการวิจัยในปีที่ 3 เนื่องจากมีข้อมูลการสร้างแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เอไมเดสจาก *E. aerogenes* ที่พบว่ามีควมคล้ายคลึงกับโครงสร้างของเอนไซม์ไนไตรเลส จาก *Xanthomonas campestris* ซึ่งเป็น เอนไซม์ที่ตัดพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนและไนโตรเจนที่ไม่ใช่พันธะเพปไทด์ ในกลุ่มของเอนไซม์สลายไนไตรล์ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ที่ *E. aerogenes* จะมีศักยภาพในการสลายสารประกอบไนไตรล์ โดยเฉพาะอะคริลาไมด์ที่เป็นสารตั้งต้นของการผลิตอะคริลาไมด์และพบการปนเปื้อนสูงในสิ่งแวดล้อมเช่นกัน ด้วยเหตุนี้ในปีที่ 3 ของการดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นไปที่การทดสอบศักยภาพของ *E. aerogenes* ในการสลายสารอะคริลาไมด์และสารประกอบกลุ่มไนไตรล์ชนิดอื่น เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการสลายสารประกอบไนไตรล์ในรูปของเซลล์ตรึงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ *E. aerogenes* ในการสลายอะคริลาไมด์และสารประกอบกลุ่มไนไตรล์ชนิดอื่น

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)

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

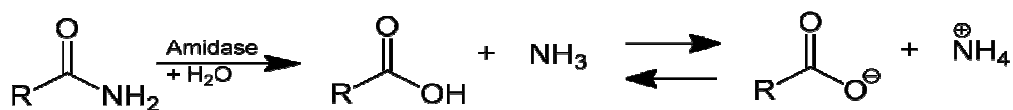
ในอีกทางหนึ่ง การเปลี่ยนหมู่เคมีด้วยกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์ (biotransformation) หรือการเลือกใช้เอนไซม์เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ของจุลินทรีย์ ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารเคมี สำหรับกระบวนการสลายทางชีวภาพสารกลุ่มไนไตรล์และเอไมด์ที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์นั้น จะมีเอนไซม์กลุ่มเฉพาะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) พันธะระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C-N bond) ที่อยู่ภายในโมเลกุลของสารกลุ่มดังกล่าวที่เรียกว่า 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 เป็นปฏิกิริยาควบคู่ของปฏิกิริยาที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไนไตรล์ไฮเดรเตส (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

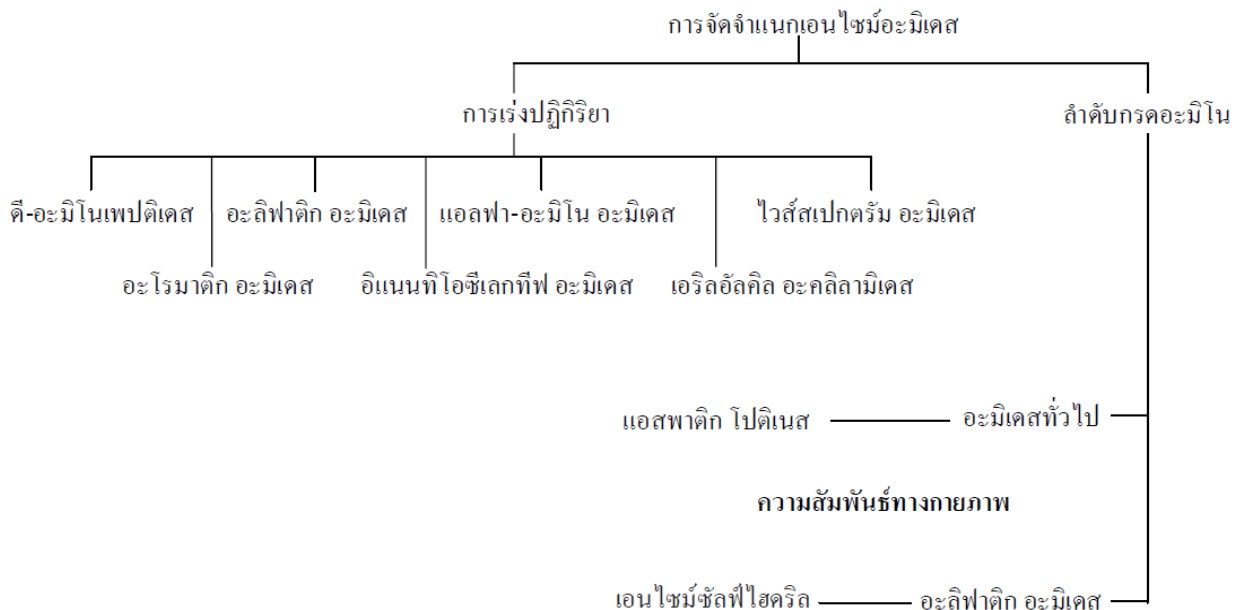
เอนไซม์เอไมเดสหรือเอนไซม์อะมิโดไฮโดรเลส (amidohydrolase) มีเลขตามระบบคือ EC 3.5.1.4 จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) กรดคาร์บอกซิลิกเอไมด์ โมเลกุลเดี่ยว (monocarboxylic acid amide) ได้ผลิตภัณฑ์สองชนิดคือ คาร์บอกซิเลต (carboxylate) และเอมีน (amine) ในรูปของแอมโมเนีย 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 และความใกล้เคียงของวงควานวิวัฒนาการ (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, ไฮยาไนด์ไฮเดรทาส (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)

สำหรับการจัดจำแนกกลุ่มของเอนไซม์เไมเดสจากความใกล้เคียงของวงค์วานวิวัฒนาการพบว่า ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์อะลิฟาติกเไมเดสนั้นมีความใกล้เคียงทางวงค์วานวิวัฒนาการกับยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ไนโตรเลส และพบว่ามีการฐานทางวิวัฒนาการมาจากกลุ่มเอนไซม์ซัลไฮไดรล (sulfhydryl enzyme family) โดยมีรายงานว่ากรดอะมิโนซิสเทอีนเป็นกรดอะมิโนหลักที่ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ในกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งมีการยืนยันจากแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เไมเดสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่ถูกสร้างขึ้นโดยใช้โครงสร้างของฟลิกเอนไซม์ไนโตรเลส NitFhit เป็นแบบจำลองแม่แบบ พบบริเวณที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไนโตรเลสคือ Cys-Glu-Lys (Novo et al., 2002) และพบกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับบริเวณแอคทีฟ ซึ่งมีความอนุรักษ์สูงในกลุ่มเอนไซม์เไมเดสที่มีการคัดเลือกโครงสร้างอีนานทิโอ 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 ดังนั้นจึงมีข้อสรุปที่อาจจะเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เไมเดสที่เร่งปฏิกิริยาแบบคัดเลือกโครงสร้างอีนานทิโอเมอร์ซึ่งต้องเร่งปฏิกิริยาควกับเอนไซม์ไนโตรเลสเไมเดสเหล่านั้นมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับเอนไซม์แอสปาติกโปรตีนเนส 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) โดยการเข้าจับกับหมู่ซัลไฮไดรล (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) ได้โดยซัคซิเนท (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 ในโมเลกุลของเอนไซม์ประกอบด้วยเหล็กแปดโมล 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 และพบว่าในโมเลกุลของเอนไซม์มีโคบอลต์ (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 โดยแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้ประโยชน์สารอะคริลาไมด์ได้ด้วยความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 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

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

2.1.5 อะคริโลไนไตรล์

อะคริโลไนไตรล์($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{N}$) อาจรู้จักในชื่ออื่น ได้แก่ 2-โพรเพนไนไตรล์ (2-propenenitrile) ไวนิลไซยาไนด์ (vinylcyanide) ไซยาโนเอทิลีน(cyanoethylene) ไซยาโนอีทีน (cyanoethene) เวนท็อก (ventox) และไนไตรล์อะคริลิก (nitrile acrylique) เป็นสารเคมีที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 53.1 กรัมต่อโมล (<http://www.summacheeva.org> สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2558) มีสถานะเป็นของเหลวที่มีกลิ่นฉุน มีความสามารถในการละลายน้ำ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 75.1 กรัมต่อลิตร มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ -83.55 องศาเซลเซียส มีจุดเดือด 77.3 องศาเซลเซียส จุดวาบไฟ -5 องศาเซลเซียส (ในถ้วยปิด) อะคริโลไนไตรล์สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น แอลกอฮอล์ (alcohol), อีเทอร์ (ether), อะซีโตน (acetone), เบนซีน (benzene), คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbontetrachloride), โทลูอิน (toluene) และคีโรซีน (cherosene) เป็นต้น อุณหภูมิที่สามารถลุกติดไฟได้คือ 481 องศาเซลเซียส เมื่อเผาไหม้สมบูรณ์ในที่ที่มีอากาศมากเกินพอ จะทำให้เกิดไอน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) และไนโตรเจนไดออกไซด์ (nitrogendioxide) แต่การเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์จะมีก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbonmonoxide), ออกไซด์ของไนโตรเจน (nitrogen oxide) และไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) ซึ่งเป็นก๊าซพิษเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยาได้กับวัสดุตัวพาหลายชนิด อาทิเช่น ทองแดงหรืออัลลอยของทองแดง และอลูมิเนียม (<http://monographs.iarc.fr> สืบค้นเมื่อ 1 กุมภาพันธ์ 2558)

2.1.6 ความเป็นพิษของอะคริโลไนไตรล์

อะคริโลไนไตรล์เป็นสารระเหยได้ ไม่มีสี เป็นของเหลวที่สามารถติดไฟได้ มีกลิ่นเหมือนเมล็ดถั่วไหม้ ละลายได้ในน้ำและในตัวทำละลายอินทรีย์ หากพบการปนเปื้อนในอากาศในช่วงร้อยละ 3.05 -17 อาจทำให้เกิดการระคายเคือง และไอที่ได้จากการระเหยจะให้สารพิษไซยาไนด์ ที่เป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจของมนุษย์ การผลิตอะคริโลไนไตรล์โดยทั่วไปได้มาจากการทำปฏิกิริยาคลอรีเนชัน (chlorination) ของเบนซีน (benzene) หรือคลอโรเบนซีน (chlorobenzene) โดยมีเฟอร์ริกออกไซด์ (ferric oxide) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามด้วยการกลั่นแบบแยกส่วนหรือการทำให้เป็นผลึกจากส่วนผสมของเบนซีนที่ถูกคลอรีเนต (chlorinated benzene) (<http://webdb.dmsc.moph.go.th> สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2558) เมื่อถูกความร้อนอะคริโลไนไตรล์จะเกิดการย่อยสลายบางส่วนให้ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) และ ไนโตรเจนออกไซด์ (nitrogen oxide) และทำปฏิกิริยารุนแรงกับกรดเข้มข้นและสารออกซิแดนท์ (oxidants) กัดกร่อนพลาสติกและยาง และสามารถถูก

ไหม้ติดไฟได้ เมื่อเกิดเพลิงไหม้ ก๊าซหรือไอระเหย (ไนโตรเจนออกไซด์และไฮโดรเจนไซยาไนด์) ที่เกิดขึ้น จะสามารถไหลไปตามพื้นได้ จึงอาจติดไฟในระยะห่างออกไป ส่วนผสมของไอหรืออากาศอาจจะระเบิดได้ จึงเสี่ยงต่อการติดไฟหรือการระเบิดเมื่อถูกต่างแก๊สและกรดแก่ (<http://www.summacheeva.org> สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2558)

ความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน สารอะคริโลไนไตรล์สามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยการซึมผ่านผิวหนังซึ่งจะทำให้เกิดอาการผื่นแดง เป็นตุ่มน้ำใสๆ บริเวณผิวหนังตักสะเก็ด และมีอาการระคายเคือง หากมีการสูดดมจะเกิดอาการเวียนศีรษะ ปวดศีรษะ ขาดออกซิเจน น้ำตาไหล จาม เจ็บคอ หายใจติดขัด คลื่นไส้ รู้สึกอ่อนเพลีย หมดสติ และอาจเสียชีวิตได้ หรือหากรับประทานสารอะคริโลไนไตรล์เข้าไปจะส่งผลเป็นพิษเฉียบพลันต่อระบบประสาทส่วนกลาง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงให้สารไซยาไนด์ (cyanide) (U.S. EPA, 1988)

สำหรับความเป็นพิษแบบเรื้อรังของอะคริโลไนไตรล์นั้น จะส่งผลกระทบต่อความทรงจำ การมองเห็น อาจทำให้ความดันโลหิตต่ำ ระบบการทำงานของตับผิดปกติ และอาจทำให้โลหิตจาง เนื่องจากอะคริโลไนไตรล์ จัดอยู่ในกลุ่มสารเคมี 2A คือกลุ่มสารเคมีที่มีหลักฐานเพียงพอว่าทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง และอาจทำให้เกิดมะเร็งในคนได้ (<http://webdb.dmso.moph.go.th> สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2558) นอกจากนี้ International Agency for Research on Cancer (IARC) ยังระบุให้ อะคริโลไนไตรล์อยู่ในสารเคมีกลุ่ม 2B คือ มีความเป็นไปได้ที่จะก่อมะเร็งในมนุษย์ (probably human carcinogen) เพราะยังมีหลักฐานไม่เพียงพอสำหรับการก่อมะเร็งในมนุษย์ นอกจากนี้มีหลักฐานการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองเท่านั้น (<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Index.php> สืบค้นเมื่อ 1 กุมภาพันธ์ 2558)

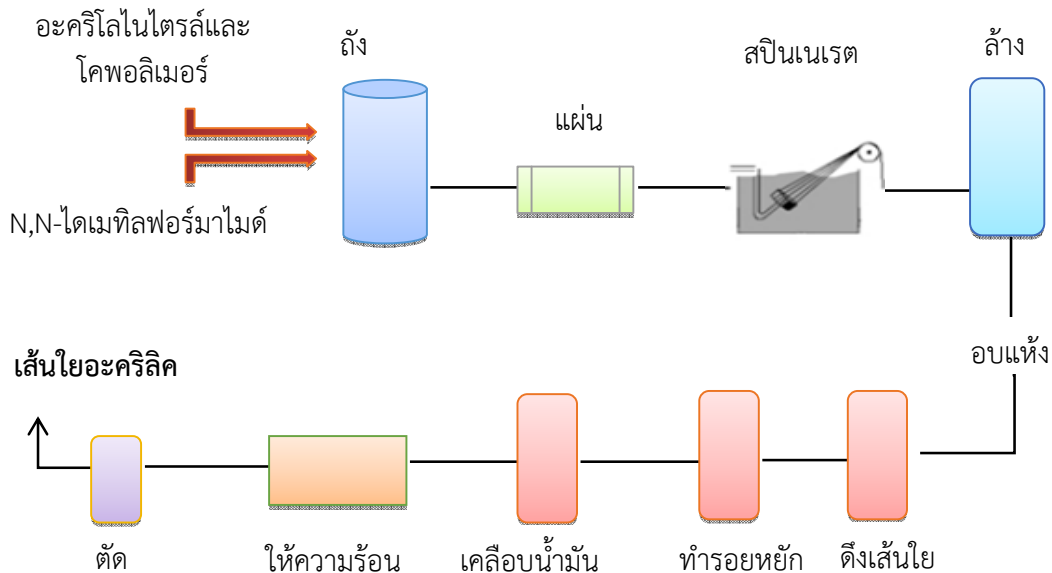
นอกจากนี้การสัมผัสอะคริโลไนไตรล์ยังสามารถกระตุ้นอาการแพ้ต่อผิวหนังทำให้เกิดโรคผิวหนัง และมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้การหายใจผิดปกติ หัวใจเต้นช้าลง เม็ดเลือดแดงผิดปกติ เม็ดเลือดขาวน้อยลง ทำให้โลหิตจาง ทำให้ตับแข็งเป็นดีซ่าน ไตอักเสบ รวมทั้งมีผลต่ออวัยวะ ทำให้จำนวนสเปิร์มลดลงอีกด้วย (<http://www.summacheeva.org> สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2558)

2.1.7 การประยุกต์ใช้อะคริโลไนไตรล์ในกระบวนการอุตสาหกรรม

ปัจจุบันมีอุตสาหกรรมหลายชนิดที่มีการใช้อะคริโลไนไตรล์เป็นสารต้นต่อ (precursor) หรือตัวทำละลายในระบบการผลิต ยกตัวอย่างเช่น

- 1) การใช้อะคริโลไนไตรล์ในการผลิตเส้นใยอะคริลิก (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นพลาสติกใส ที่มีความแข็งแรงปานกลาง เป็นรอยขีดข่วนได้ง่าย เป็นฉนวนไฟฟ้าได้ดี และสามารถละลายในตัวทำละลายเบนซีน, อะซิโตน และคลอโรฟอร์ม พลาสติกชนิดนี้สามารถนำมาใช้เป็นป้ายโฆษณา โคมไฟ กระจกแว่นตา กรอบพระห้อยคอ และเป็นเส้นใยในการทำไหมพรมได้ (พิชิต เลี่ยมพิพัฒน์, 2540) โดยจะใช้อะคริโลไนไตรล์ร้อยละ 95 ไวนิลอะซิเตทมอนอเมอร์ (vinylacetate monomer; VAM) ร้อยละ 4 และอื่นๆ จำพวกสารเติมแต่ง ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น N,N-ไดเมทิลฟอร์มามิด (N,N-dimethylformamide) ในถังปฏิกรณ์ จากนั้นสารละลายที่ได้จะถูกกรองโดยแผ่นกรอง และผ่านเข้าไปในกระบวนการสปินเนต (spinnerettes) ซึ่งสารละลายจะถูกอัดผ่านหัวจ่ายออกมาเป็นเส้นใย จากนั้นเส้นใยจะถูกดึงผ่านน้ำเพื่อลดอุณหภูมิไปตามลูกกลิ้ง และถูกส่งไปยังถังตัวทำละลายที่ยังติดอยู่ตามเส้นใยด้วยน้ำร้อนก่อนเข้าระบบอบแห้ง (drying) จากนั้นจะถูกส่งไปยังหน่วยดึงเส้นใย หน่วยทำรอยหยัก (crimping) เพื่อทำเส้นใยให้เป็นรอยหยักเหมือนเส้นใยธรรมชาติก่อนที่จะนำเส้นใยไปทำการเคลือบน้ำมัน

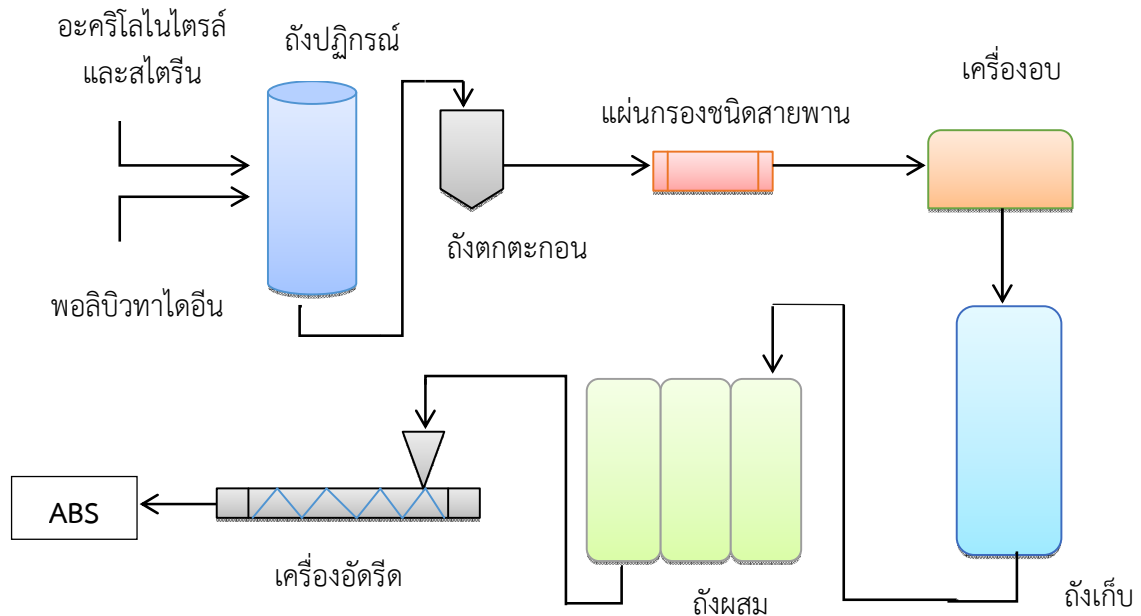
(oil coating) และให้ความร้อนเพื่อให้เส้นใยคงรูปที่หน่วยเซตตัว (setting dryer) ก่อนที่จะตัดเป็นเส้นเล็กๆ ที่หน่วยตัด (cutting) ส่งไปเก็บเพื่อการจำหน่าย (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)



ภาพที่ 4 กระบวนการผลิตเส้นใยอะคริลิก (ดัดแปลงภาพมาจาก กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)

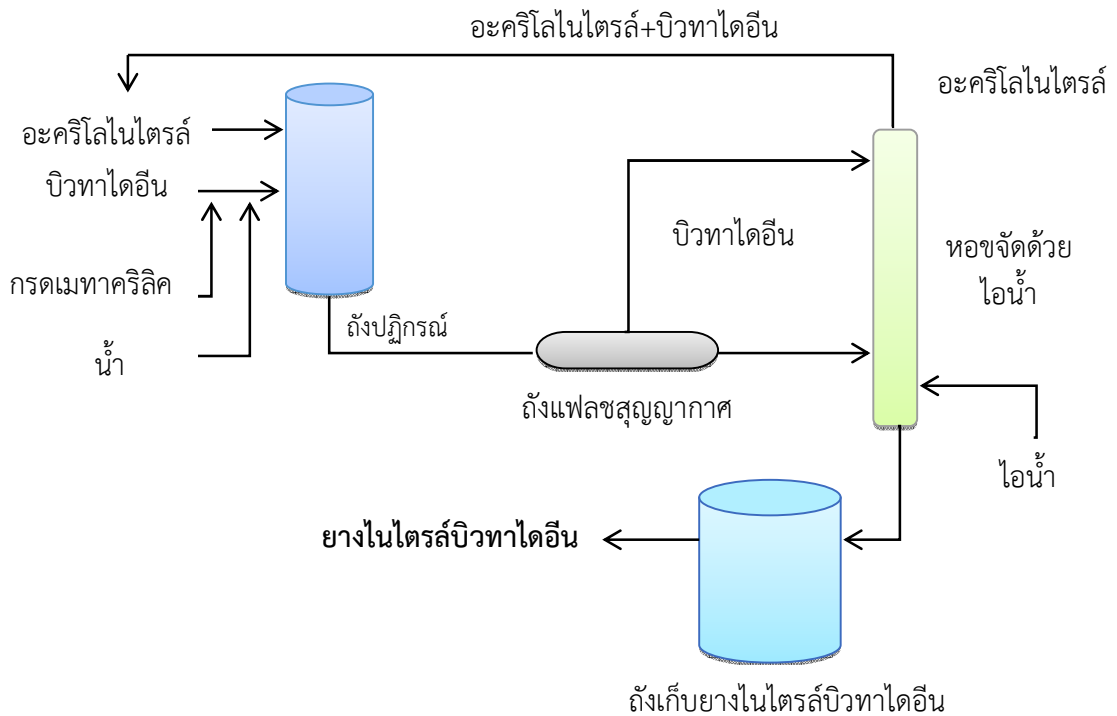
2) การใช้อะครีโลไนไตรล์ในการผลิตพลาสติกอะครีโลไนไตรล์บิวทาไดอีนส์ไตรีน (acrylonitrile-butadiene-styrene; ABS) (ภาพที่ 5) ซึ่งมีสมบัติคือสามารถทนต่อแรงกระแทกได้ดี มีความแข็งแรง ทนความร้อนสูงถึง 212 องศาเซลเซียส เป็นฉนวนไฟฟ้าได้ดี ABS ชนิดต่างๆ ยังมีสมบัติเด่น คือ สามารถชุบโลหะได้ดี มีอัตราการไหลสูง มีการหน่วงเหนี่ยวการติดไฟที่ดี มีการเกาะติดของสีที่ดี และทนต่อตัวทำละลายจำพวกทินเนอร์ ประโยชน์ของพลาสติกชนิดนี้คือ ใช้ทำหมวกกันน็อก ผนังตู้เย็น แผงหน้าปัดรถยนต์ ชิ้นส่วนรถจักรยานยนต์ และชิ้นส่วนรถยนต์ รวมไปถึงอุปกรณ์เครื่องใช้ไฟฟ้า (พิชิต เลี่ยมพิพัฒน์, 2540) ABS เป็น เทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ของโมโนเมอร์ 3 ชนิด คือ สไตรีน (styrene) อะครีโลไนไตรล์ (acrylonitrile) และบิวทาไดอีน (butadiene) โมโนเมอร์แต่ละชนิดที่ใช้เป็นวัตถุดิบสังเคราะห์ ABS ขึ้นมานั้นล้วนมีผลต่อสมบัติของพลาสติกทั้งสิ้น อะครีโลไนไตรล์มีผลต่อสมบัติการทนความร้อนและสารเคมี บิวทาไดอีนมีผลต่อสมบัติความทนทานต่อแรงกระแทก (impact strength) และสไตรีนมีผลทำให้พลาสติกมีพื้นผิวเป็นมันเงา ตัดแต่งวัสดุได้ง่าย และช่วยลดต้นทุน (<http://www.tfcplastech.com> สืบค้นเมื่อ 16 มีนาคม 2558) กระบวนการผลิต ABS เป็นกระบวนการแบบอิมัลชัน (emulsion process) โดยพอลิบิวทาไดอีน (polybutadiene) จะทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันกับอะครีโลไนไตรล์สไตรีน และสารเติมแต่ง (additive) ในถังปฏิกรณ์ จะใช้อะครีโลไนไตรล์ประมาณร้อยละ 15 - 35 พอลิบิวทาไดอีนร้อยละ 5 - 30 และสไตรีนร้อยละ 40 - 60 จากนั้นพอลิเมอร์ผสมจะถูกส่งไปยังหน่วยตกตะกอน (loculation) โดยมีการเติมสารช่วยตกตะกอน (flocclulants) เพื่อช่วยให้ส่วนที่เป็นพอลิเมอร์แยกตัว และแขวนลอยอยู่ในรูปของเหลวข้น ก่อนจะถูกส่งไปยังแผ่นกรองแบบสายพาน (belt filter) เพื่อทำการรีดน้ำออก จากนั้นส่งไปอบแห้งโดยการเป่าลมร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และนำเม็ดพอลิเมอร์ที่ได้เก็บไว้ในถังเก็บ เพื่อรอการผสมกับสีและสารเติมแต่งอื่นๆ

ก่อนที่จะถูกส่งไปที่เครื่องอัดรีด (extruder) และตัดเป็นเม็ดพลาสติกเพื่อนำส่งไปจำหน่ายต่อไป (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)



ภาพที่ 5 กระบวนการผลิตเม็ดพลาสติก อะครีโลไนไตรล์ บิวทาไดอิน สไตรีน (ดัดแปลงภาพจาก กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)

3) การผลิตน้ำยางสังเคราะห์ไนไตรล์บิวทาไดอิน (nitrile butadiene rubber latex, NBR Latex) (ภาพที่ 6) ยางชนิดนี้มีขั้วสูง จึงทำให้ยางชนิดนี้มีสมบัติเด่นคือทนต่อน้ำมันปิโตรเลียม และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วต่างๆ ได้ดี เนื่องจากยางชนิดนี้ประกอบด้วยสองส่วนคือส่วนที่เป็น บิวทาไดอิน ซึ่งจะให้ความยืดหยุ่น และส่วนที่เรียกว่า อะครีโลไนไตรล์ซึ่งเป็นส่วนที่จะทำให้คุณสมบัติของยาง NBR เปลี่ยนแปลงไป หากยิ่งเพิ่มปริมาณอะครีโลไนไตรล์ จะทำให้มีความทนต่อน้ำมันและตัวทำละลายกลุ่มไฮโดรคาร์บอนสูงขึ้น อัตราการซึมผ่านก๊าซลดลง สมบัติการหักงอที่อุณหภูมิต่ำลดลง ความทนทานต่อความร้อนและโอโซนสูงขึ้น ความต้านทานการขีดถูสูงขึ้น ความแข็งและความทนทานต่อแรงดึงสูงขึ้น ความหนาแน่นสูงขึ้น (<http://www.summacheeva.org> สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2558) วัตถุประสงค์ในการผลิตน้ำยางสังเคราะห์ NBR ประกอบด้วยอะครีโลไนไตรล์ประมาณร้อยละ 25 บิวทาไดอินประมาณร้อยละ 71 และกรดเมทาคริลิก (metacrylic acid) ร้อยละ 4 (สัดส่วนของอะครีโลไนไตรล์ที่มากขึ้นจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความคงทนแข็งแรง ทนต่อการละลาย และน้ำมันมากขึ้น) วัตถุประสงค์ทั้งหมดจะนำส่งไปยังถังปฏิกรณ์ โดยใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาประมาณ 5 - 12 ชั่วโมง เมื่อวัตถุดิบเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ NBR Latex ตามค่าที่ควบคุม (ร้อยละ 93 - 95) จะมีการเติมสารหยุดปฏิกิริยาลงไป จากนั้น NBR Latex ที่มีลักษณะคล้ายน้ำยางธรรมชาติจะถูกส่งไปยังถังฟลัชสุญญากาศ (vacuum flash) เพื่อแยกบิวทาไดอิน และหอขจัดด้วยไอน้ำ (steam stripper) เพื่อแยกอะครีโลไนไตรล์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกและนำกลับไปใช้ใหม่ให้ได้ NBR Latex บริสุทธิ์ส่งไปเก็บที่ถังต่อไป (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)



ภาพที่ 6 กระบวนการผลิตน้ำยางสังเคราะห์ NBR (ดัดแปลงภาพจาก กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)

4) การใช้สารอะครีโลไนไตรล์เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเม็ดพลาสติกพอลิเมทิลเมตะครีเลต (polymethyl methacrylate, PMMA) เพื่อการผลิตพลาสติกทางวิศวกรรม เช่น กระจกไฟท้ายรถยนต์ กล้องไฟ โคมฉาย เลนส์แว่นตา จอโทรทัศน์มือถือ จอโทรทัศน์ จอคอมพิวเตอร์แบบแอลซีดี (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)

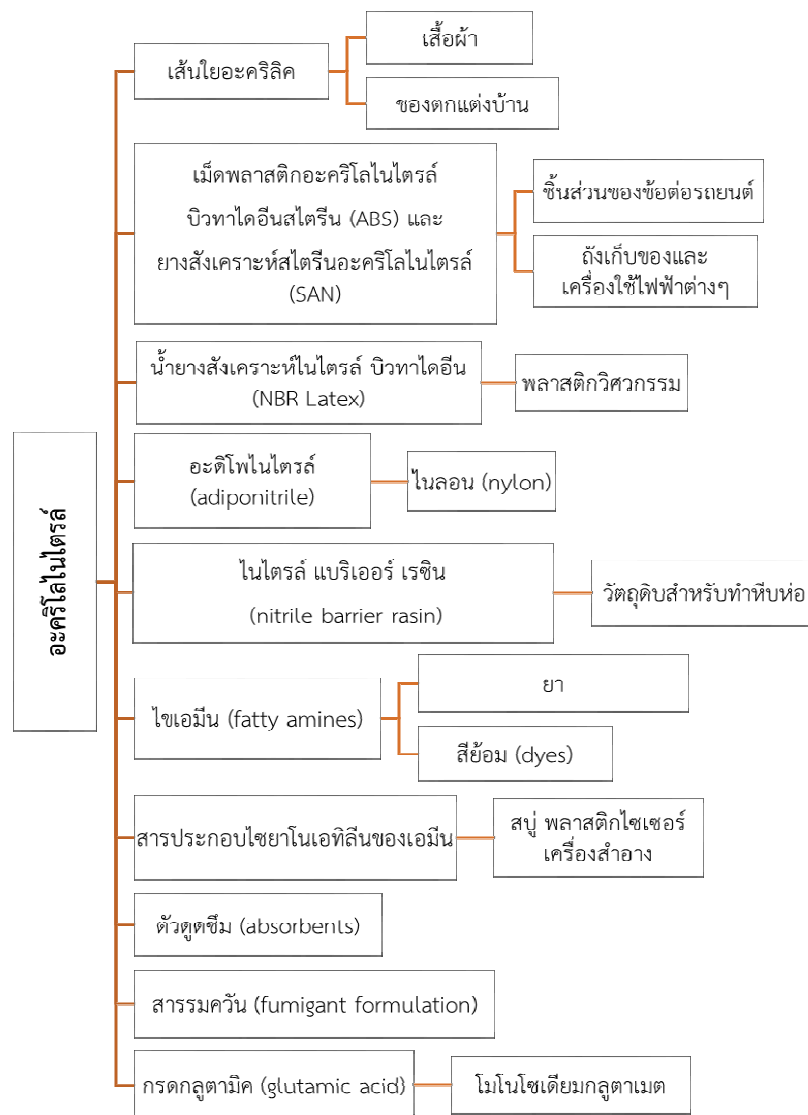
5) การใช้อะครีโลไนไตรล์ผลิตพลาสติกชนิดโคพอลิเมอร์ที่ผสมระหว่างอะครีโลไนไตรล์บิวทาไดอีน-สไตรีน (ABS) และ โพลีเอไมด์ (polyamide; PA) ซึ่งรวมจุดแข็งทั้งหมดของแต่ละส่วนประกอบไว้ด้วยกันคือ มีการทนแรงกระแทกที่ดีเยี่ยม ทั้งในอุณหภูมิสูงและต่ำ การหดตัวลดลงเมื่อเทียบกับวัสดุ PA แบบดั้งเดิม มีคุณภาพผิวสูง ขึ้นรูปง่าย ทนต่อสารเคมี ทนความร้อน และนำใช้งาน (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)

6) การใช้อะครีโลไนไตรล์ในการผลิตเม็ดพลาสติกชนิดอะครีโลไนไตรล์สไตรีน (acrylonitrile styrene; SAN) เป็นเม็ดพลาสติกที่ให้สมบัติความใส ความแข็ง ความแกร่ง ความเหนียว มีสมบัติให้ความมันเงา ความคงรูปสูง การทนความร้อน และสารเคมีได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทนต่อแรงเฉือนได้ดี การทนความร้อนนิยมนำไปใช้ในงานฉีด (injection molding) ได้แก่ ชิ้นส่วนยานยนต์ เครื่องใช้ภายในบ้าน และเครื่องใช้ไฟฟ้า เป็นต้น (<http://www.spm-amp.com/> สืบค้นเมื่อ 1 พฤษภาคม 2558)

7) การใช้สารอะครีโลไนไตรล์เป็นสารตัวกลางในการผลิตอะคริลาไมด์ (acrylamide) และกรดอะคริลิก (acrylic acid) (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551) อะคริลาไมด์เป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในกระบวนการอุตสาหกรรมไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมน้ำมัน การผลิตกระดาษ หมึกพิมพ์ เครื่องสำอาง การทำคอนแทคเลนส์ และนำมาใช้ในการสังเคราะห์พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สำคัญที่เป็นองค์ประกอบของไส้

กรองในเครื่องกรองน้ำ (จิตติมา เจริญพานิช, 2551) และกรดอะคริลิกใช้ในการผลิตเรซินแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange resin) ใช้ในการผลิตกระดาษ กาว และใช้ในการเคลือบเรซิน (<http://msds.pcd.go.th> สืบค้นเมื่อ 16 มกราคม 2558)

จากตัวอย่างจะเห็นได้ว่าอะครีโลไนไตรล์เป็นสารต้นตอ หรือสารตัวกลางที่สำคัญในการผลิตสารเคมีที่มีความสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมหลายชนิด ภาพที่ 7 แสดงภาพรวมการใช้อะครีโลไนไตรล์ในกระบวนการอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้สารอะครีโลไนไตรล์ในการผลิตอะคริลิก และเส้นใยพลาสติก ยางไนไตรล์ และพลาสติก และใช้เป็นสารรมควันในการเก็บเมล็ดพืช



ภาพที่ 7 การประยุกต์ใช้สารอะครีโลไนไตรล์ในอุตสาหกรรมต่างๆ (ดัดแปลงภาพมาจากกรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)

กรมเชื้อเพลิงธรรมชาติและพลังงานมีรายงานถึงปริมาณการใช้อะคริโลไนไตรล์จำแนกตามประเภทผลิตภัณฑ์ สรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณการใช้อะคริโลไนไตรล์จำแนกตามประเภทผลิตภัณฑ์ (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2551)

ประเภทผลิตภัณฑ์	ปริมาณการใช้ในปี พ.ศ. 2550 (ตัน)
เส้นใยอะคริลิก	82,000
ยางสังเคราะห์ SAN	18,000
ยางสังเคราะห์ NBR	11,900

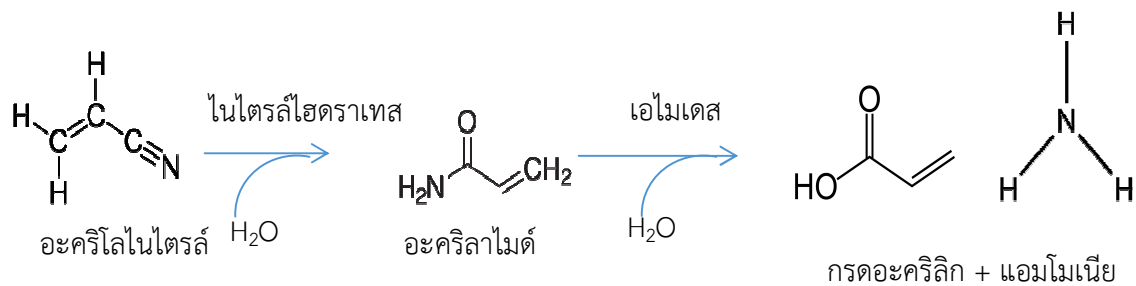
อะคริโลไนไตรล์เป็นสารที่มีอันตรายร้ายแรงมากโดยเฉพาะเมื่อติดไฟจะระเบิดขึ้นได้เมื่ออยู่ในห้องที่ไม่มีการระบายอากาศ (U.S. EPA, 1988) เนื่องจากไม่มีการใช้สารอะคริโลไนไตรล์ในรูปสารบริสุทธิ์ หรือสารละลายผสมในบ้านเรือน ดังนั้นการปนเปื้อนของสารอะคริโลไนไตรล์ ในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่จึงมาจากภาคอุตสาหกรรม ได้แก่ จากกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา ดังเคยมีตัวอย่างการระเบิดและเพลิงไหม้ของถังเก็บอะคริโลไนไตรล์ที่ Anjalankoski ประเทศฟินแลนด์ (www.onnettomuustutkinta.fi สืบค้นเมื่อ 17 กุมภาพันธ์ 2558) หรือในระหว่างการขนส่ง เช่น เมื่อวันที่ 5 กันยายน พ.ศ. 2544 พบอุบัติเหตุรถบรรทุกสารอะคริโลไนไตรล์ พลิกคว่ำบนทางด่วนจุดที่มีการจราจรหนาแน่นจุดหนึ่งของกรุงเทพมหานคร (<http://www.greenpeace.org/> สืบค้นเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2558) รวมทั้งการนำ อะคริโลไนไตรล์ไปใช้ในการผลิตสินค้าในระดับอุตสาหกรรมทำให้พบการปนเปื้อนในน้ำ ซึ่งอาจเกิดจากการรั่วไหลจากโรงงานสารเคมี หรืออาจมีการปนเปื้อนของอะคริโลไนไตรล์มาจากน้ำทิ้งเสียของโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจึงจำกัดอยู่เฉพาะบริเวณโรงงานหรือเกิดจากอุบัติเหตุจากการขนส่งดังกล่าวมาแล้วเท่านั้น (Going et al., 1979)

2.1.8 การสลายอะคริโลไนไตรล์โดยจุลินทรีย์

สารอะคริโลไนไตรล์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่อาจมาพร้อมกับน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมในกระบวนการผลิตนั้น เป็นเหตุที่ทำให้ต้องมีการกำจัดหรือหาแนวทางและวิธีการกำจัดสารอะคริโลไนไตรล์ ให้พบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมในปริมาณน้อยที่สุด จากอดีตถึงปัจจุบันมีวิธีการกำจัดสารอะคริโลไนไตรล์หลากหลายวิธี เช่น การย่อยสลายโดยแสง (photodegradation) ได้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Knoevenagel and Himmelreich, 1976) หรือการบำบัดทางเคมีการเผาไหม้โดยตรงหรือการเผาไหม้โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (<http://www.pcd.go.th> สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2558) ซึ่งมักทำให้เกิดปัญหามลพิษทางอากาศตามมา ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์หันมาสนใจวิธีการกำจัดสารอะคริโลไนไตรล์โดยใช้แบคทีเรียย่อยสลายหรือใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียเปลี่ยนรูปสารอะคริโลไนไตรล์เป็นสารอื่นที่มีความเป็นพิษน้อยลง ดังที่เคยมีรายงานการวิจัยที่ศึกษาการใช้ *Pseudomonas chlororaphis* B23 ย่อยสลายอะคริโลไนไตรล์ โดยพบว่าเอนไซม์ไนไตรล์ไฮเดรทาส (nitrile hydratase) และเอนไซม์เอไมเดส (amidase) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสลายอะคริโลไนไตรล์ นอกจากนี้ยังพบความสามารถในการสลายสารประกอบไนไตรล์อีกหลายชนิด เช่น โพรไพโอไนไตรล์ (propionitrile) เอนบิวทิโรไนไตรล์ (N-butyronitrile) และไซยาไนด์ (cyanide) (Nagasawa et al., 1987) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ต้นทุนต่ำ และมีประสิทธิภาพสูง โดยประสิทธิภาพในการสลายจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ ตัวทำละลาย

อินทรีย์ หรือแม้กระทั่งการปนเปื้อนของสารพิษอื่นๆ รวมไปถึงความสามารถในการปรับตัวของแบคทีเรียในการเจริญและย่อยสลายอะคริโลไนไตรล์ด้วย

เอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเลส เป็นเอนไซม์สำหรับการผลิตภาคอุตสาหกรรมของอะคริลาไมด์ และโคตินาไมด์ (contrinamide) (Yamada and Kobayashi, 1996) และใช้เอนไซม์เหล่านี้สำหรับการบำบัดทางชีวภาพไนไตรล์จากน้ำเสีย (Wyatt and Knowles, 1995) สำหรับการย่อยสลายของสารอะคริโลไนไตรล์ พบว่าอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเลส ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนอะคริโลไนไตรล์ เป็นอะคริลาไมด์ จากนั้นเอนไซม์เอไมเดส จะเปลี่ยนสารอะคริลาไมด์ไปเป็นกรดอะคริลิก และแอมโมเนีย ดังแสดงในภาพที่ 8 ซึ่งเป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษน้อยลงและไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ปฏิกิริยานี้เป็นที่น่าสนใจในการสังเคราะห์และการประยุกต์ใช้บำบัดทางชีวภาพต่างๆ (Mylerova and Martinkova, 2003; Sachi and Lindsay, 2007)



ภาพที่ 8 การสลายอะคริโลไนไตรล์โดยเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเลสและเอไมเดส (ดัดแปลงภาพมาจาก <http://biocyc.com> สืบค้นเมื่อ 1 พฤษภาคม 2558)

จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากให้ความสนใจในการย่อยสลายทางชีวภาพของสารอะคริโลไนไตรล์โดยจุลินทรีย์ มีรายงานวิจัยหลายฉบับศึกษาแบคทีเรียที่สามารถใช้ประโยชน์อะคริโลไนไตรล์เป็นแหล่งพลังงานและสารอาหารในการเจริญ ตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1987 ในรายงานวิจัยของ Nagasawa และคณะ ที่ศึกษาการใช้ *Pseudomonas chlororaphis* B23 ย่อยสลายอะคริโลไนไตรล์ โดยพบว่า เอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเลสและเอนไซม์เอไมเดส เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสลายอะคริโลไนไตรล์ นอกจากนี้ยังพบความสามารถในการสลายสารประกอบไนไตรล์อีกหลายชนิด เช่น โพรไพโอไนไตรล์ (propionitrile), เอนบิวทิโรไนไตรล์ (N-butylonitrile) และไซยาไนด์ (cyanide) ต่อมาในปี ค.ศ. 1991 Mohamed S. Nawaz และคณะทำการแยก *Klebsiella pneumonia* จากน้ำเสียของโรงงาอุตสาหกรรม พบว่าสามารถเจริญได้ในอะคริโลไนไตรล์ และมีความสามารถในการใช้อะลิฟาติกเอไมด์และไนไตรล์ (aliphatic amide/nitrile) ที่มีสายคาร์บอนยาว 1-5 อะตอม เช่น อะซิตาไมด์ (acetamide), โพรไพโอनाไมด์ (propionamide) หรือ เบนโซไนไตรล์ (benzonitrile) เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเดียวในการเจริญ พบความสามารถในการย่อยสลายอะคริโลไนไตรล์ได้ 6.15 มิลลิโมลาร์ และอะคริลาไมด์ได้ 5.15 มิลลิโมลาร์ ภายใน 24 ชั่วโมง *K. pneumonia* มีเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเลส และเอไมเดสเป็นเอนไซม์สำคัญในการย่อยสลายสารประกอบไนไตรล์ โดยเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเลสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสและเอไมเดสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองคือค่าพีเอชเท่ากับ 8.0

ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 Linardi, Dias และ Rosa คัดแยกยีสต์ *Candida famata* จากน้ำทิ้งในเหมืองทอง พบว่าสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มี อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) อะคริโลไนไตรล์ บิวทิโรไนไตรล์

(butyronitrile), ไอโซบิวทิโรไนไตรล์ (isobutyronitrile), เมททาคริลไนไตรล์ (methacrylonitrile), โพรไพโอไนไตรล์, ซักซินไนไตรล์ (succinonitrile), วาเลโรไนไตรล์ (valeronitrile), อะซีตาไมด์ (acetamide), ไอโซบิวทาไมด์ (isobutamide) และ ซักซินาไมด์ (succinamide) เป็นแหล่ง ไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นถึงร้อยละ 4 การใช้ประโยชน์จาก อะซีโตไนไตรล์ และ อะซีตาไมด์ ของสายพันธุ์ *C. famata* อาจจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาสองขั้นตอนของเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเลสและเอไมเดสที่เกิดขึ้นภายในเซลล์สามปีต่อมา Dhillon และ Shivaraman (1999) คัดแยกแบคทีเรียจากดิน และระบุชนิดเป็น *Pseudomonas* sp. (S1) เมื่อทดสอบศักยภาพในการย่อยสลายสารไนไตรล์ที่แตกต่างกัน พบว่าสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีไนไตรล์ต่อไปนี้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนคือ อะซีโตไนไตรล์, บิวทิโรไนไตรล์, อะคริโลไนไตรล์, อะดิพไนไตรล์ (adiponitrile), เบนโซไนไตรล์ (benzonitrile), กลูตาโรไนไตรล์ (glutaronitrile), ฟีนิลอะซีโตไนไตรล์ (phenylacetoneitrile) และซักซินไนไตรล์ (succinonitrile) แบคทีเรียนี้มีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ คือสามารถเปลี่ยนสารประกอบอะลิฟาติกไนไตรล์ที่อิ่มตัว (saturated aliphatic nitrile), อะลิฟาติกโอเลฟินิกไนไตรล์ (aliphatic olefinic nitrile), อะโรมาติกไนไตรล์ (aromatic nitrile) และอัลคิลไนไตรล์ (alkyl nitriles) รวมทั้งอัลคาไลไซยาไนด์ (alkali cyanide) ได้เป็นกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) และปี ค.ศ 2000 Dias และคณะได้คัดแยก *Candida guilliermondii* UFMG-Y65 จากน้ำทิ้งในการทำเหมืองทอง พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์สลายไนไตรล์ (nitrile hydrolyzing enzyme) ที่สามารถสลายสารเบนโซไนไตรล์ได้ถึง 12 มิลลิโมลาร์ เป็นกรดเบนโซอิก 11 มิลลิโมลาร์ และสลายสารอะคริโลไนไตรล์ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นกรดอะคริลิก 7.9 มิลลิโมลาร์

Deshkar และคณะ (2003) คัดแยกแบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนอะคริโลไนไตรล์ และระบุชนิดเป็น *Citrobacter freundii* ที่สามารถใช้อะคริโลไนไตรล์ความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 Wang, Lee และ Chen คัดแยก *Comamonas testosterone* และ *Acidovorax* sp. จากระบบบำบัดน้ำเสียในการทำพลาสติก พบความสามารถของแบคทีเรียในการสลายสารอะคริโลไนไตรล์และเบนโซไนไตรล์ คือ *C. testosterone* สามารถที่จะสลาย อะคริโลไนไตรล์ 1,904.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 66.6 ชั่วโมง และ *Acidovorax* sp. สามารถสลายอะคริโลไนไตรล์ 1,538.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 143.3 ชั่วโมง โดยพบว่า *C. testosterone* สามารถสลายอะคริโลไนไตรล์ ได้ดีกว่า *Acidovorax* sp. และแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ยังสามารถสลายสารโพรไพโอไนไตรล์ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบรายงานของ Boxter, Garton และ Cummins (2006) ที่แยก *Rhodococcus* sp. AJ 270 จากดิน ที่สามารถสลายอะคริโลไนไตรล์ได้ หรืองานวิจัยของ Ma และคณะ (2010) ที่คัดแยก *Rhodococcus ruber* TH ที่สามารถสลายอะคริโลไนไตรล์ได้อีกด้วย

2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในปีที่ 3 ของโครงการวิจัย

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสลายอะคริลอไมด์ *E. Aerogenes* ในการสลายอะคริโลไนไตรล์และสารประกอบกลุ่มไนไตรล์ชนิดอื่น

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทดสอบผลของความเข้มข้นอะคริโลไนไตรล์ต่อการเจริญของ *E. aerogenes*

นำ *E. aerogenes* มาเลี้ยงลงในอาหารเหลวนิวเทรียนส์ (Nutrient broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ถ่ายเชื้อเจริญร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลวเกลือต่ำ W-minimal medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ถ่ายเชื้อเจริญร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลวเกลือต่ำ W-minimal medium ที่มีการเติมสารอะคริโลไนไตรล์ความเข้มข้นต่างกัน ระหว่างร้อยละ 0.02 และร้อยละ 0.25 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งพลังงานเดียว บ่มเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบการเจริญจากผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่เวลา 0 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง เพื่อเลือกความเข้มข้นของอะคริโลไนไตรล์ที่ทำให้เชื้อเจริญสูงสุดมาทำการทดลองต่อไป

3.2 การติดตามการสลายอะคริโลไนไตรล์ของ *E. aerogenes*

บ่มเลี้ยง *E. aerogenes* ในอาหารเหลวนิวเทรียนส์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อเจริญร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ลงในอาหารเหลวนิวเทรียนส์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มปริมาณมวลเซลล์ (cell mass) โดยการถ่ายเชื้อเจริญร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไปในอาหารเหลวนิวเทรียนส์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อเจริญมาปั่นเก็บตะกอนเซลล์ ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลวเกลือต่ำ จำนวน 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์อีกครั้ง (resuspension) ลงในอาหารเหลวเกลือต่ำปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำสารละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ ถ่ายลงในอาหารเหลวเกลือต่ำปริมาตร 2 ลิตร ที่มีการเติมอะคริโลไนไตรล์ลงไปความเข้มข้นร้อยละ 0.02 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ติดตามการเจริญและการสลายอะคริโลไนไตรล์ทุกๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Perform Liquid Chromatography; HPLC) เพื่อดูปริมาณของอะคริโลไนไตรล์ที่ลดลง และปริมาณของอะคริลาไมด์ และกรดอะคริลิกที่เพิ่มขึ้นและลดลง โดยเก็บตัวอย่างเชื้อเจริญไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดคัตกรอง 0.45 ไมโครเมตรนำไปวัดค่าฟลูออโรสเซนซ์ของอาหารเลี้ยง ติดตามการเจริญของแบคทีเรียจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดปริมาณของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสลายอะคริโลไนไตรล์ด้วยวิธีของฟีนิต (Phenatmethod) (<http://www.fisheries.go.th> สืบค้นเมื่อเมื่อ 22 เมษายน 2558) และนับ

จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ โดยการเจือจางเชื้อเจริญที่ความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-6} และกระจายเซลล์ลงบนอาหารเกลือต่ำชนิดแข็ง (W-minimalmedium agar) ที่มีการเติมสารอะคริโลไนไตรล์ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งพลังงาน สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จะเลือกใช้ตัวติดตามยูวี(UV detector)ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือสารผสมของอะซิโตนไนไตรล์ร้อยละ 0.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเมทานอลร้อยละ 0.05 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใช้เฟสคงที่ (stationary phase) คือคอลัมน์คาร์บอน 18 อะตอม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.9 มิลลิเมตร ความยาว 300 มิลลิเมตร(ขนาดอนุภาคบรรจุ 10 ไมโครเมตร ระยะห่างระหว่างอนุภาคเท่ากับ 125 อังสตรอม) ควบคุมอัตราการไหลให้คงที่เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ในช่วงเวลาต่างๆจะอยู่ในรูปของเหลว ซึ่งจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมากรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดคัตกรอง 0.45 ไมโครเมตรก่อนนำมาวิเคราะห์โดยจะทำการฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ทุกการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้งและรายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ภาคผนวกที่ 1 แสดงโครมาโทแกรมของสารผสมอะคริโลไนไตรล์ อะคริลาไมด์ และกรดอะคริลิก เมื่อผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ภายใต้สภาวะดังกล่าว ทำการเทียบความเข้มข้นของอะคริโลไนไตรล์อะคริลาไมด์ และกรดอะคริลิก กับกราฟมาตรฐานในภาคผนวกที่ 2-4

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียโดยวิธีของฟิเนต

นำตัวอย่างที่ได้ที่เวลาต่างกันของการเจริญ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายฟีนอล (Phenol solution) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (ผสมสารละลายฟีนอล(C_6H_5OH) (ร้อยละ 89 น้ำหนักต่อปริมาตร) 1.11 มิลลิลิตร กับเอทานอล (ethanol; C_2H_6O) ปริมาตร 8.89 มิลลิลิตร** ให้เตรียมใช้แต่ละอาทิตย์) สารละลายโซเดียมไนโตรปริสไซด์ (sodium nitroprusside solution; $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (ละลายโซเดียมไนโตรปริสไซด์ ปริมาตร 20 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร **เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีชาไม่เกิน 1 เดือน) สารละลายออกซิไดส์(oxidation solution) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (อัลคาไลน์ซิเตรท (alkaline citrate) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรกับโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite; $NaOCl$) ปริมาตร 25 มิลลิกรัมผสมเข้าด้วยกันหรือในอัตราส่วน 4:1 (** สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกวัน) นำสารผสมไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เพื่อวัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้น ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้งและรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้เทียบกับกราฟมาตรฐานแอมโมเนีย (ภาคผนวกที่ 5) เพื่อหาปริมาณของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในกระบวนการสลายอะคริโลไนไตรล์

3.4 การทดสอบความสามารถในการสลายสารกลุ่มไนไตรล์ของ *E. aerogenes*

เลี้ยง *E. aerogenes* ในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีการเติมสารกลุ่มไนไตรล์ต่างชนิดลงไปโดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ (1) สารประกอบอะลิฟาติกไนไตรล์ ที่มีอะตอมของคาร์บอนต่อกันเป็นโซ่ยาว (hydrocarbon chains) และไม่มีอะตอมของคาร์บอนต่อกันเป็นวงแหวน(aromatic systems) เลย ได้แก่ อะซิโตนไนไตรล์โพรไพโอไนไตรล์ และบิวทิโรไนไตรล์ (2) สารอนุพันธ์ของอะคริโลไนไตรล์ คือ กลูตาโรไนไตรล์และอะดิโปไนไตรล์ และ (3)

สารประกอบอะโรมาติกไนไตรล์ซึ่งเป็นสารประกอบไนไตรล์ที่มีส่วนหนึ่งส่วนใดของโมเลกุลเป็นวงแหวนคือ เบนโซไนไตรล์ (ภาคผนวกที่ 6) สารเหล่านี้ถูกนำมาทดสอบเป็นแหล่งพลังงานเดียวของแบคทีเรีย ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยการบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วที่ 250 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ตามที่ได้อธิบายมาแล้วในข้อ 3.2 เทียบหาความเข้มข้นที่ลดลงของสารไนไตรล์ที่ทดสอบคำนวณเป็นร้อยละการสลาย (% conversion)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลของความเข้มข้นอะคริไลไนไตรล์ต่อการเจริญของ *E. aerogenes*

เมื่อนำ *E. aerogenes* มาเลี้ยงในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีอะคริไลไนไตรล์เป็นแหล่งพลังงานเดียวที่ระดับความเข้มข้นอะคริไลไนไตรล์ต่างกันและเทียบอัตราการเจริญ จากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 คือ *E. aerogenes* สามารถใช้อะคริไลไนไตรล์เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญได้ทุกความเข้มข้นแต่สามารถเจริญได้สูงสุดที่ความเข้มข้นอะคริไลไนไตรล์ ร้อยละ 0.02 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ตารางที่ 2 ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของ *E. aerogenes* ที่เจริญในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีอะคริไลไนไตรล์ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของอะคริไลไนไตรล์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	ΔOD_{600}
0.02	0.60
0.04	0.51
0.06	0.46
0.08	0.42
0.10	0.40
0.15	0.30
0.20	0.23

4.2 การติดตามการสลายอะคริไลไนไตรล์ของ *E. aerogenes*

การติดตามการสลายอะคริไลไนไตรล์ของ *E. aerogenes* ในอาหารเหลวเกลือต่ำที่มีอะคริไลไนไตรล์ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งพลังงานเดียว จากปริมาณของอะคริไลไนไตรล์ที่ลดลงและปริมาณของอะคริลาไมด์และกรดอะคริลิกที่เพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และจากปริมาณของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยการวัดด้วยวิธีของฟิเนต พบว่า *E. aerogenes* สามารถใช้อะคริไลไนไตรล์เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญ และเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สูงที่สุดเท่ากับ 1.05 และมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ 9.27×10^6 (ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร) จากนั้นอัตราการเจริญของแบคทีเรียจะค่อยๆ ซ้ำลงอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะเซลล์ตาย (death phase หรือ decline phase) ต่อไป เมื่อพิจารณาถึงการใช้อะคริไลไนไตรล์เป็นแหล่ง

พลังงานพบว่า *E. aerogenes* สามารถสลายอะคริโลไนไตรล์เป็นแหล่งพลังงานในการสร้างเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง และมีการผลิตอะคริลาไมด์ ซึ่งเป็นสารตัวกลางเกิดขึ้นตามการลดลงของอะคริโลไนไตรล์ โดยพบความเข้มข้นของอะคริลาไมด์สูงสุดคือ 7.31 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 21 ชั่วโมง ก่อนที่อะคริลาไมด์จะค่อยๆ ถูกสลายเป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนียต่อไป โดยพบปริมาณแอมโมเนียและกรดอะคริลิกสูงสุดเท่ากับ 0.73 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร และ 11.17 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 15 และ 48 ของการเลี้ยง ขณะที่ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดการเลี้ยงเจริญ ดังแสดงในภาพที่ 9 สำหรับโครมาโตแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรล์ที่เวลาต่างๆ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC แสดงในภาคผนวกที่ 7

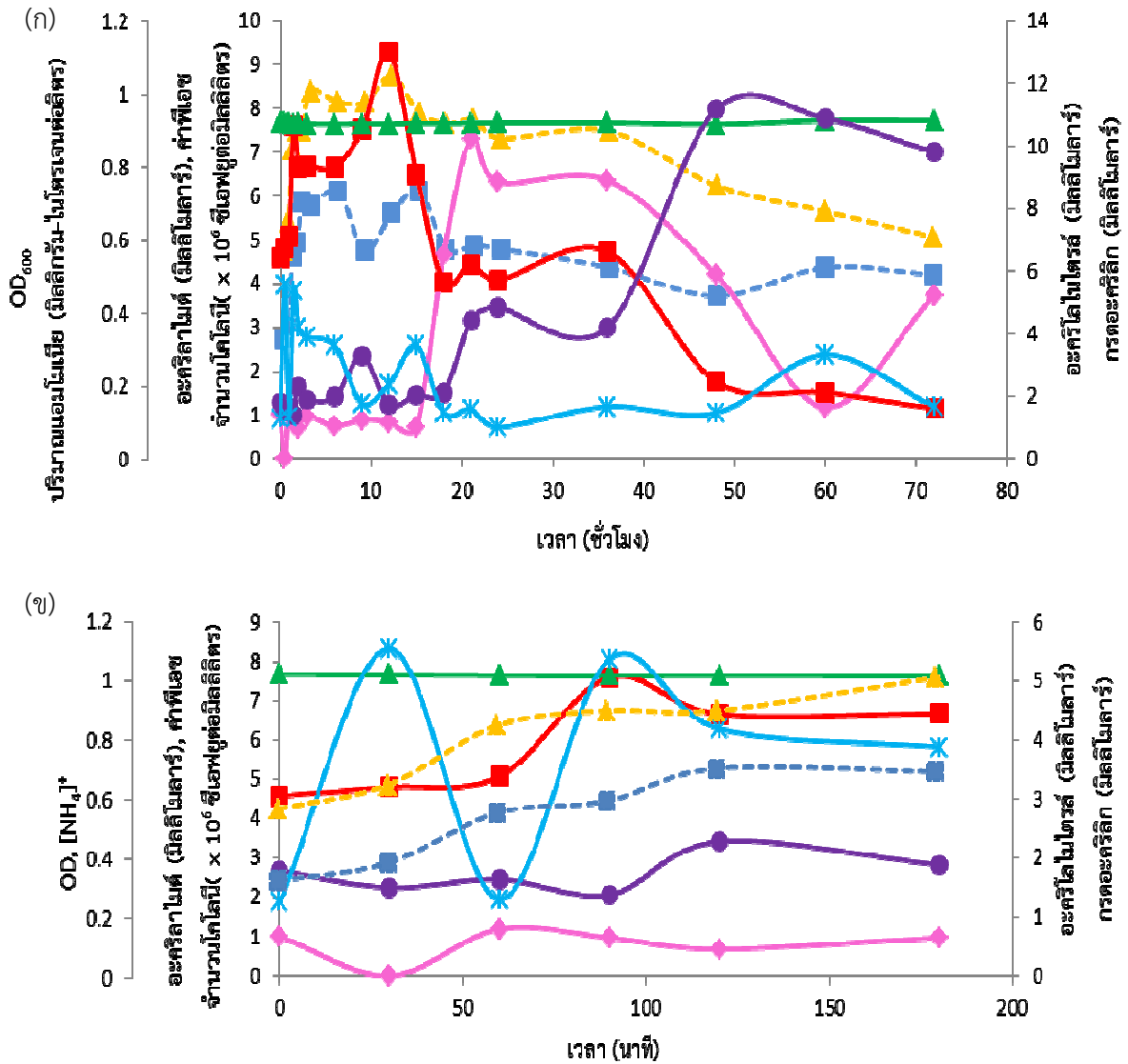
4.3 การทดสอบความสามารถในการสลายสารกลุ่มไนไตรล์ของ *E. aerogenes*

เมื่อนำ *E.aerogenes* มาเลี้ยงในสภาวะที่มีสารกลุ่มไนไตรล์ชนิดต่างกัน เป็นแหล่งพลังงานเดียว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และติดตามการสลายไนไตรล์จากการลดลงของสารไนไตรล์ตั้งต้น ด้วยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า *E. aerogenes* สามารถสลายสารไนไตรล์กลุ่มอะลิฟาติกได้ในร้อยละการเปลี่ยนแปลงต่างกันคือ *E. aerogenes* ชอบที่จะสลายอะคริโลไนไตรล์ได้สูงที่สุดที่ร้อยละ 43 รองลงมาคือ โพรไพโอไนไตรล์ (ร้อยละ 30) อะซิโตไนไตรล์ (ร้อยละ 23) และ บิวทิโรไนไตรล์ (ร้อยละ 15) ตามลำดับ และยังสามารถสลายสารกลุ่มอะโรมาติกไนไตรล์คือ เบนโซไนไตรล์ได้เล็กน้อยที่ร้อยละ 9 แต่ไม่สามารถสลายอนุพันธ์ของอะลิฟาติกไนไตรล์คือ กลูตาโรไนไตรล์ และ อะดิโปไนไตรล์ได้ ผลการทดลองสรุปในตารางที่ 3 สำหรับโครมาโตแกรมของการสลายสารไนไตรล์แต่ละชนิดเมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC แสดงในภาคผนวกที่ 8

ตารางที่ 3 การสลายสารกลุ่มไนไตรล์โดย *E. aerogenes*

สารไนไตรล์	ร้อยละของการสลาย
อะซิโตไนไตรล์	23
อะคริโลไนไตรล์	43
โพรไพโอไนไตรล์	30
บิวทิโรไนไตรล์	15
กลูตาโรไนไตรล์	-
อะดิโปไนไตรล์	-
เบนโซไนไตรล์	9

หมายเหตุ (-) คือ ไม่เกิดการสลายของอะคริโลไนไตรล์โดย *E. aerogenes*



ภาพที่ 9 (ก) การสลายอะคริไลไนโตรลโดย *E.aerogenes* ที่เวลาต่างกัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเกลือต่ำ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ค่าพีเอชเท่ากับ 7 (ข) กราฟขยายของรูป (ก) กำหนดให้ (—■—) คือ ความเข้มข้นของแอมโมเนีย, (---▲---) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร, (—◆—) คือ ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์, (—■—) คือ จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย, (—▲—) คือ ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยง, (—●—) คือ ความเข้มข้นของกรดอะคริลิก, และ (—*—) คือ ความเข้มข้นของอะคริไลไนโตรล

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

อะคริโลไนไตรล์เป็นสารเคมีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในท้องปฏิบัติการณ์ทั่วไปและใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภทเช่น ใช้เป็นส่วนประกอบของยางรถยนต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอะคริลิกไฟเบอร์ ใช้เป็นสารประกอบในพลาสติก ตลอดจนใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง ถึงแม้จะมีประโยชน์และมีการใช้อย่างแพร่หลายแต่สารอะคริโลไนไตรล์ก็มีความเป็นพิษ โดยอะคริโลไนไตรล์สามารถทำปฏิกิริยารุนแรงกับกรดเข้มข้นและสารออกซิแดนท์กัดกร่อนพลาสติกและยาง และสามารถถูกไหม้ติดไฟได้ สารอะคริโลไนไตรล์สามารถเข้าสู่ร่างกายได้โดยการซึมผ่านผิวหนัง จะทำให้เกิดอาการผื่นแดงและหากมีการรับประทานอะคริโลไนไตรล์เข้าไปจะส่งผลเป็นพิษเฉียบพลันต่อระบบประสาทส่วนกลาง รวมทั้งส่งผลต่อความทรงจำ การมองเห็น อาจทำให้ความดันต่ำ และระบบการทำงานของตับผิดปกติ ทำให้โลหิตจาง และยังมีหลักฐานว่าทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง และอาจก่อให้เกิดมะเร็งในคนได้ (<http://webdb.dmsc.moph.go.th> สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2558) แต่เนื่องจากการใช้สารอะคริโลไนไตรล์เป็นจำนวนมากและมีกำลังความต้องการเพิ่มขึ้นทุกปี ในกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ จึงทำให้มีการปล่อยสารอะคริโลไนไตรล์มากับน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมลงสู่สิ่งแวดล้อม (Going et al., 1979) ด้วยเหตุนี้การหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารอะคริโลไนไตรล์จึงเป็นสิ่งจำเป็น การใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ย่อยสลายทางชีวภาพถือเป็นวิธีการกำจัดอะคริโลไนไตรล์ที่วิธีหนึ่ง เพราะเป็นวิธีที่ให้ประสิทธิภาพสูงในการสลายอะคริโลไนไตรล์และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการสลายอะคริโลไนไตรล์ของ *E. aerogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสลายอะคริลามาไต์ (Buranasilp and Charoenpanich, 2011) เนื่องจากอะคริลามาไต์มีโครงสร้างใกล้เคียงกับอะคริโลไนไตรล์ ผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียสลายอะคริลามาไต์ *E. aerogenes* สามารถเจริญในสภาวะที่มีอะคริโลไนไตรล์ได้ จากข้อเท็จจริงที่ว่า กลไกการสลายไนไตรล์นั้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนไตรเลส (nitrilase) หรือการใช้เอนไซม์ไนไตรลิไฮดราเลสควบคู่กับเอนไซม์เอไมเดสซึ่งในกรณีของอะคริโลไนไตรล์จะเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางอะคริลามาไต์ ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์กรดอะคริลิกและแอมโมเนียในที่สุด ก่อนหน้านี้นี้มีรายงานวิจัยพบว่า *E. aerogenes* ที่คัดแยกจากน้ำทิ้งชุมชนในจังหวัดชลบุรีสามารถย่อยสลายอะคริลามาไต์ได้ (Buranasilp and Charoenpanich, 2011) โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เอไมเดสของ *E. aerogenes* มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไนไตรเลส-ไซยาไนต์ไฮโดรเลสของ *Xanthomonas maltophilia* (Suktanarag and Charoenpanich, 2012) จึงมีความเป็นไปได้ว่า *E. aerogenes* จะสามารถสลายอะคริโลไนไตรล์ได้ เมื่อติดตามการสลายอะคริโลไนไตรล์ของ *E. aerogenes* โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีผลิตภัณฑ์จากการสลายเกิดขึ้นคือ อะคริลามาไต์ กรดอะคริลิก และแอมโมเนีย โดยพบว่า *E. aerogenes* สามารถเจริญได้สูงที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุดและอยู่ได้ถึง 21 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจะลดลงอย่างรวดเร็วโดยที่ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. aerogenes* สามารถสลายอะคริโลไนไตรล์เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญในขั้นต้น ซึ่งจะเปลี่ยนอะคริโลไนไตรล์เป็นอะคริลามาไต์ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 7.31

มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 21 ชั่วโมงของการเจริญ จากนั้นอะคริลาไมด์จะถูกสลายต่อเป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนีย โดยพบผลิตภัณฑ์กรดอะคริลิกสูงสุดที่ความเข้มข้น 11.17 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ก่อนการสลาย ขณะที่ปริมาณแอมโมเนียมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากเกิดการขับออกนอกเซลล์ เพื่อรักษาสมดุลภายในเซลล์ (Charoenpanich, 2013) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการสลายอะคริโลไนไตรล์เป็นปัจจัยที่มาจากเจริญของ *E. aerogenes* จากนั้นเซลล์จะใช้อะคริลาไมด์ที่เกิดขึ้นเป็นแหล่งพลังงานเพื่อผลิตกรดอะคริลิก ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นต่อไป (Charoenpanich, 2013) การพบสารตัวกลางอะคริลาไมด์ในระหว่างเกิดการสลายของอะคริโลไนไตรล์นั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า *E. aerogenes* มีระบบการสลายอะคริโลไนไตรล์จากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ไนไตรล์ไฮดราเลสและเอไมเดสมากกว่าการใช้เอนไซม์ไนไตรล์เลส ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาวิถีการสลายอะคริโลไนไตรล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ต่อไป

5.2 สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ *E.aerogenes* มีศักยภาพในการสลายสารอะคริโลไนไตรล์และสารไนไตรล์อื่นๆ

บรรณานุกรม

- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2551). คู่มือการจัดการสารเคมีอันตรายสูง อะคริโลไนไตรล์ (Acrylonitrile). สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- จิตติมา เจริญพานิช. (2551). อะคริลาไมด์ : ก่อตัวได้ง่ายกำจัดไม่ยาก (Acrylamide: its formation and degradation). "Veridian E-Journal Silpakorn University" ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 เดือนกันยายน หน้า 68-79.
- พิชิต เลี่ยมพิพัฒน์. (2540). พลาสติก. พิมพ์ครั้งที่ 14 ห้างหุ้นส่วนจำกัด ป. สัมพันธ์พานิช.
- Almatawah Q. A., Cramp R., and Cowan D. A. (1999). Characterization of an inducible nitrilase from a thermophilic bacillus. *Extremophiles*. 3: 283-291.
- Asano, Y., Fujishiro, K., Tani, Y., & Yamada, H. (1982a). Aliphatic nitrile hydratase from *Arthrobacter* sp. J-1 purification and characterization. *Agricultural and Biological 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-glucosaminy) asparagines amidase F in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 265: 6967-6972.
- Benerjee, A., Sharma, R., & Banerjee, U. C. (2002). The nitrile degrading enzymes: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 33-44.
- 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.
- Boxter, J., Garton, N. J., & Cummings, S. P. (2006). The impact of acrylonitrile and bioaugmentation on the biodegradation activity bacterial community structure of topsoil. *Folia Microbiology*. 51 (6): 591-597.

- 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 Patil, Y. B., Rao, P., (eds.) *Applied Bioremediation–Active and passive Approaches*. 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.
- 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.
- Deshkar, A., Dhamorikar, N., Godbole, S., Krishnamurthi, K., Saravanadevi, S., Vijay, R., Kaul, S., & Chakrabarti, T. (2003). Bioremediation of soil contaminated with organic compounds with special reference to acrylonitrile. *Annual Chemistry*. 93: 729-737.
- 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.
- Going, J. E., Long, P., Onstot, S., & Thcmask, J. (1979). Environmental monitoring near industrial site: acrylonitrile. 6-79.
- 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-hydroxybenzoxynitrile 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.
- 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.
- Knoevenagel, K., & Himmelreich, R. (1976). Degadation of compounds containing carbon atoms by photooxidation in the presence of water. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 4: 324-333.
- 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 rhodochromus* 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.
- Langdanhl, 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.
- Linardi, V. R., Dias, J. C., & Rosa, C. A. (1996). Utilization of acetonitrile and other aliphatic nitriles by a *Candida famata* strain. *FEMS Microbiology Letters*. 144(1) : 67-71.
- 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.
- Ma, Y., Yu, H., Pan, W., Liu, C., Zhang, S., & Shen, Z. (2010). Identification of nitrile hydratase-producing *Rhodococcus ruber* TH and characterization of an amiE-negative mutant. *Bioresource Technology*. 101 (1): 285-291.
- 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 rhodochromus* 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.

- Mylerova, V., & Martinkova, L. (2003). Synthetic applications of nitrile-converting enzymes. *Current Organic Chemistry*. 17: 1279-1295.
- Nagasawa, T., Nanba, H., Ryuno, K., Takeuchi, K., & Yamada, H. (1987). Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23: Purification and characterization. *European Journal of Biochemistry*. 162 (3): 691-698.
- 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.
- 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.
- Sachi, O., & Lindsay, D. (2007). Purification and characterization of a novel nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. RHA1. *Molecular Microbiology*. 65: 828-838.
- 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.

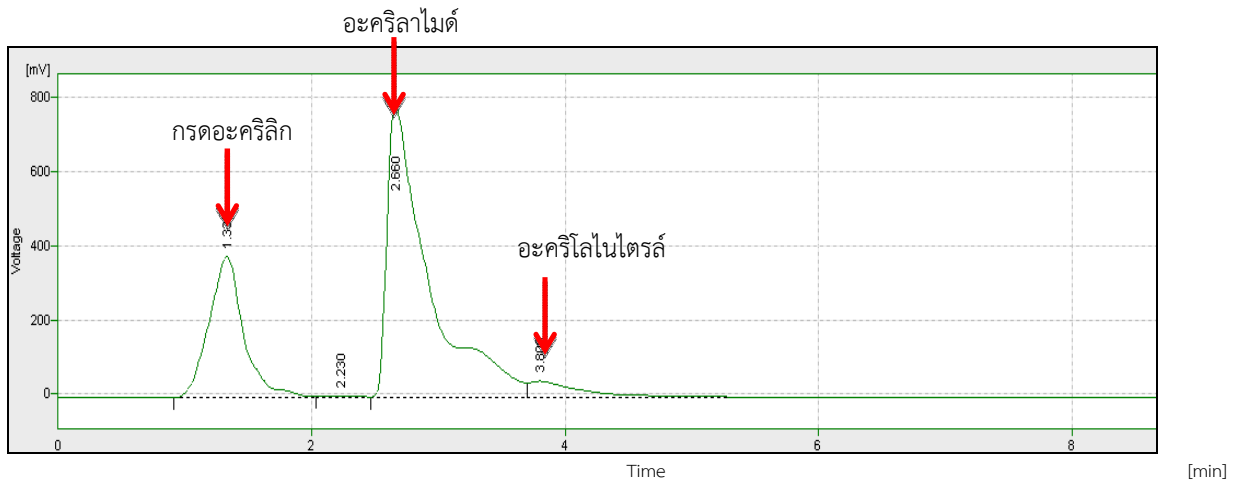
- Sheldon, R. A., & van Rantwijk, F. (2004). Biocatalysis for sustainable organic synthesis. *Australian Journal of Chemistry*. 57: 281-289.
- Sinclair, C. J., & Boxall, B. A. (2003). Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation product. *Environmental Science and Technology*. 37(20): 4617-4625.
- 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*. *Proceedings of 13th FAOBMB Congress, 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.
- 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.
- U.S. EPA. (1988). Health effects assessment for acrylonitrile. Cincinnati: Ohio 8-88.
- 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 acryl nitrile 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.
- 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.
- Wyatt, J. M., & Knowles, C. J. (1995). The development of a novel strategy for the microbial treatment of acrylonitrile effluents. *Biodegradation*. 6: 93-107.
- 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.
- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://biocyc.com/> [สืบค้นเมื่อ 1 พฤษภาคม 2558]

- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://www.fisheries.go.th/> [สืบค้นเมื่อ 22 เมษายน 2558]
- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://www.greenpeace.org/> [สืบค้นเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2558]
- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://www.spm-amp.com/> [สืบค้นเมื่อ 1 พฤษภาคม 2558]
- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Index.php> [สืบค้นเมื่อ 1 กุมภาพันธ์ 2558]
- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://www.msds.pcd.go.th/> [สืบค้นเมื่อ 16 มกราคม 2558]
- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://www.summacheeva.org/> [สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2558]
- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://www.tfcplastech.com> [สืบค้นเมื่อ 16 มีนาคม 2558]
- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://www.onnettomuustutkinta.fi> [สืบค้นเมื่อ 17 กุมภาพันธ์ 2558]
- [Online] แหล่งเข้าถึง <http://webdb.dmsc.moph.go.th/> [สืบค้นเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2558]

ภาคผนวกที่ 1

โครมาโทแกรมของสารผสมอะคริโลไนไตรล์ อะคริลาไมด์ และกรดอะคริลิก เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC



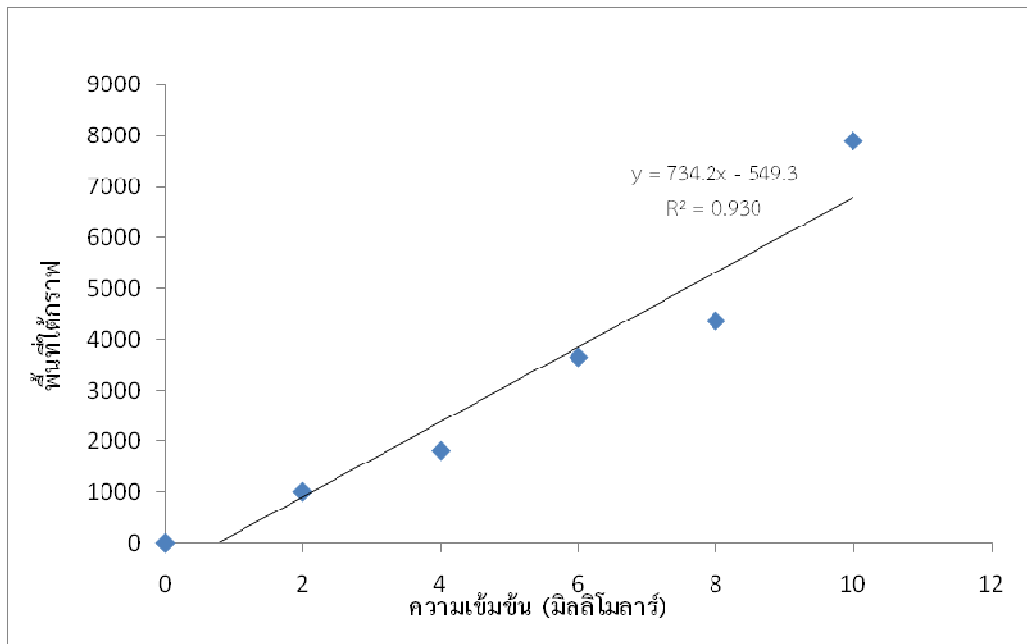
ภาพที่ ผ-1 โครมาโทแกรมของสารผสมอะคริโลไนไตรล์ อะคริลาไมด์ และกรดอะคริลิก เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC โดยใช้ตัวติดตามยูวี ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่คือ สารผสม อะซิโตนไนไตรล์ ร้อยละ 0.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเมทานอล ร้อยละ 0.05 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเฟสคงที่คือ คอลัมน์คาร์บอน 18 อะตอม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.9 มิลลิเมตร ความยาว 300 มิลลิเมตร (ขนาดอนุภาคบรรจุ 10 ไมโครเมตร ระยะระหว่างอนุภาคเท่ากับ 125 อังสตรอม) ควบคุมอัตราการไหลคงที่เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ ผ-1 เวลาที่สารผสมอะคริโลไนไตรล์ อะคริลาไมด์ และกรดอะคริลิก เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ในสถานะข้างต้น

ชนิดของสารเคมี	เวลาที่สารออก (นาที)
อะคริโลไนไตรล์	1.33
อะคริลาไมด์	2.66
กรดอะคริลิก	3.80

ภาคผนวกที่ 2

กราฟมาตรฐานของอะครีโลไนไตรล์



ภาพที่ ผ-2 กราฟมาตรฐานของอะครีโลไนไตรล์

การคำนวณปริมาณของอะครีโลไนไตรล์

จากกราฟมาตรฐานของอะครีโลไนไตรล์ ได้สมการเส้นตรงดังนี้ $y = 734.27x - 549.35$ และ $R^2 = 0.9302$

นำค่าพื้นที่ใต้กราฟจากโครมาโทแกรมที่อ่านได้เมื่อทำการวิเคราะห์หามาแทนลงในกราฟมาตรฐานของอะครีโลไนไตรล์

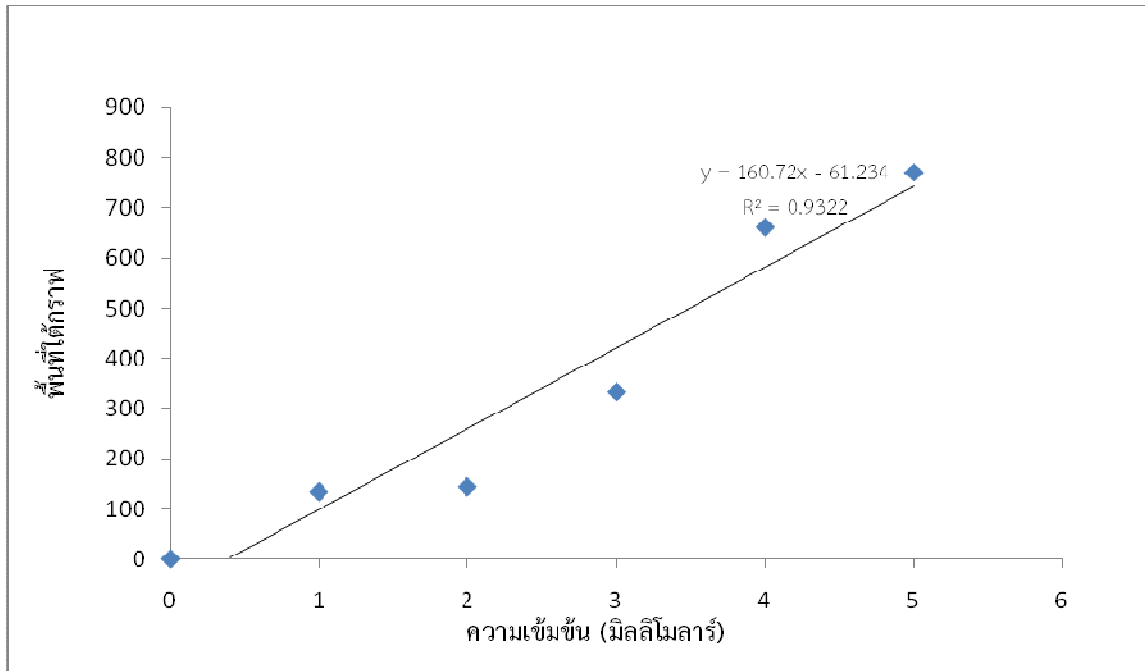
กำหนดให้

y = พื้นที่ใต้กราฟจากโครมาโทแกรม

x = ความเข้มข้นของอะครีโลไนไตรล์ (มิลลิโมลาร์)

ภาคผนวกที่ 3

กราฟมาตรฐานของอะครีลาไมด์



ภาพที่ ผ-3 กราฟมาตรฐานของอะครีลาไมด์

การคำนวณปริมาณของอะครีลาไมด์

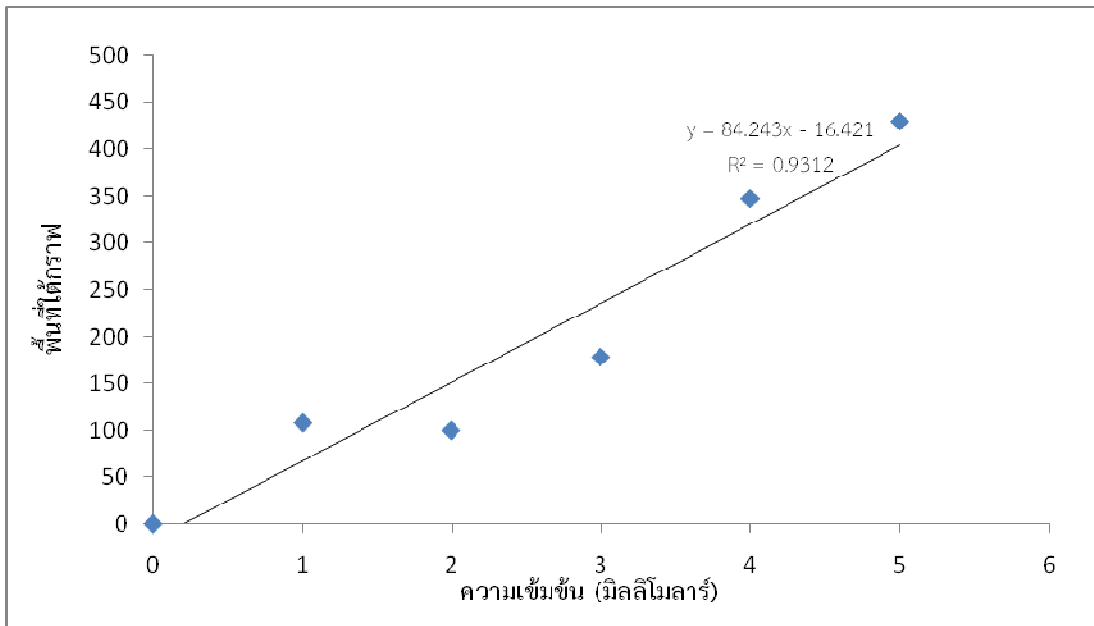
จากกราฟมาตรฐานของอะครีลาไมด์ ได้สมการเส้นตรงดังนี้ $y = 160.72x - 61.234$ และ $R^2 = 0.9322$ นำค่าพื้นที่ใต้กราฟจากโครมาโทแกรมที่อ่านได้เมื่อทำการวิเคราะห์มาแทนลงในกราฟมาตรฐานของอะครีลาไมด์ กำหนดให้

y = พื้นที่ใต้กราฟจากโครมาโทแกรม

x = ความเข้มข้นของอะครีลาไมด์ (มิลลิโมลาร์)

ภาคผนวกที่ 4

กราฟมาตรฐานของกรดอะคริลิก



ภาพที่ ๕-4 กราฟมาตรฐานของกรดอะคริลิก

การคำนวณปริมาณกรดอะคริลิก

จากกราฟมาตรฐานของกรดอะคริลิก ได้สมการเส้นตรงดังนี้ $y = 84.243x - 16.421$ และ $R^2 = 0.9312$ นำค่าพื้นที่ใต้กราฟจากโครมาโทแกรมที่อ่านได้เมื่อทำการวิเคราะห์หามาแทนลงในกราฟมาตรฐานของกรดอะคริลิก

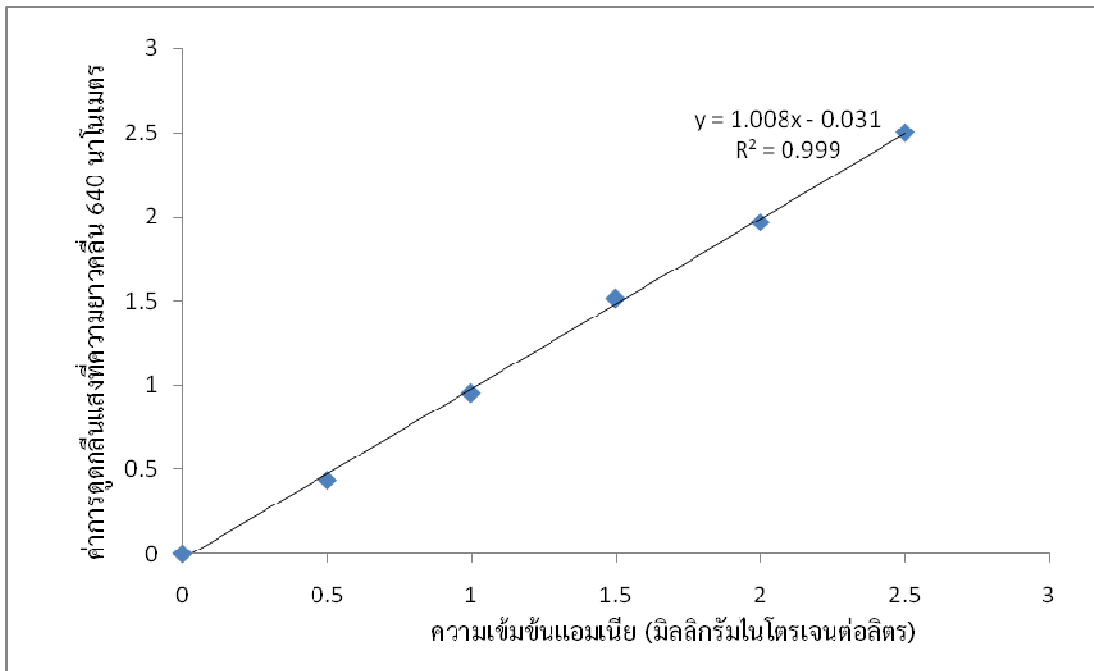
กำหนดให้

y = พื้นที่ใต้กราฟจากโครมาโทแกรม

x = ความเข้มข้นของกรดอะคริลิก (มิลลิโมลาร์)

ภาคผนวกที่ 5

กราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย



ภาพที่ ๕-5 กราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย

วิธีการคำนวณปริมาณแอมโมเนีย

จากกราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย $y=1.008x -0.031$

กำหนดให้

y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

x = ปริมาณแอมโมเนีย (มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร)

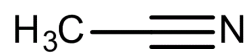
นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ที่อ่านได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอมโมเนีย

ภาคผนวกที่ 6

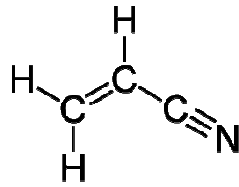
โครงสร้างทางเคมีของไนไตรล์ที่ใช้ในการศึกษา

อะลิฟาติกไนไตรล์

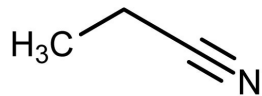
อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)



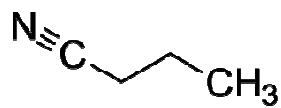
อะครีโลไนไตรล์ (Acrylonitrile)



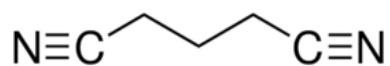
โพรไพโอไนไตรล์ (Propionitrile)



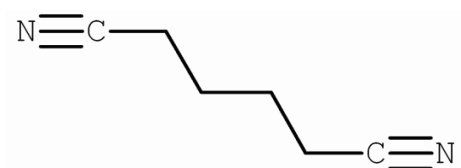
บิวทีโรไนไตรล์ (Butyronitrile)



กลูตาโรไนไตรล์ (Glutaronitrile)

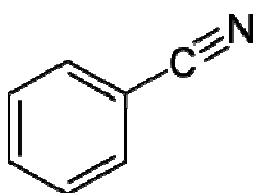


อะดิพไพนไตรล์(Adiponitrile)



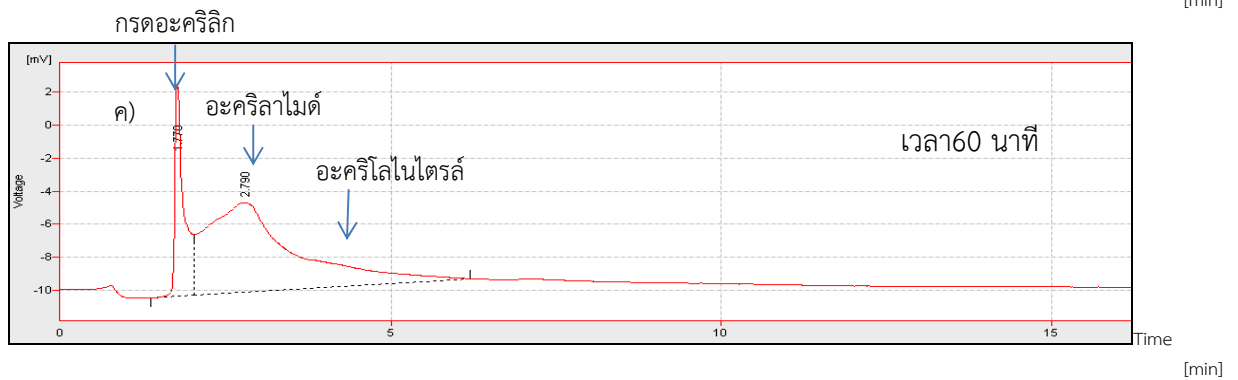
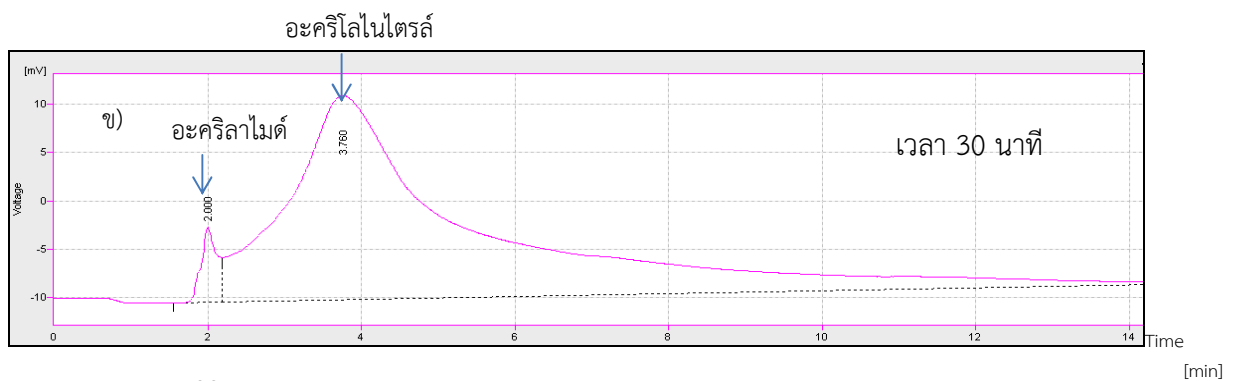
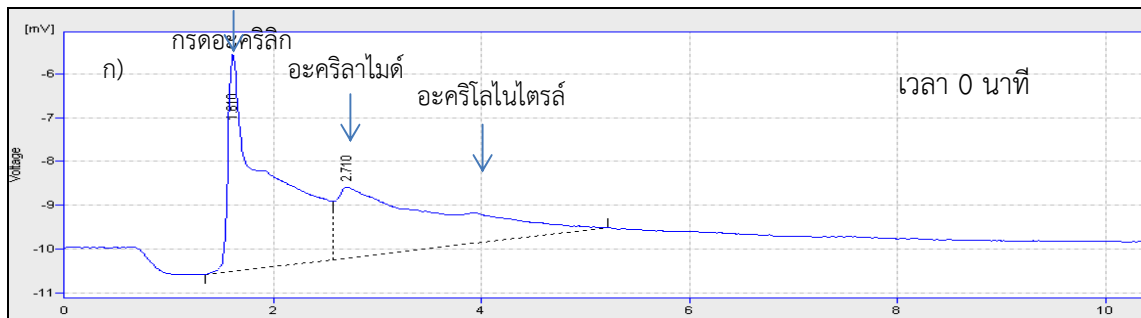
อะโรมาติกไนไตรล์

เบนโซไนไตรล์ (Benzonitrile)

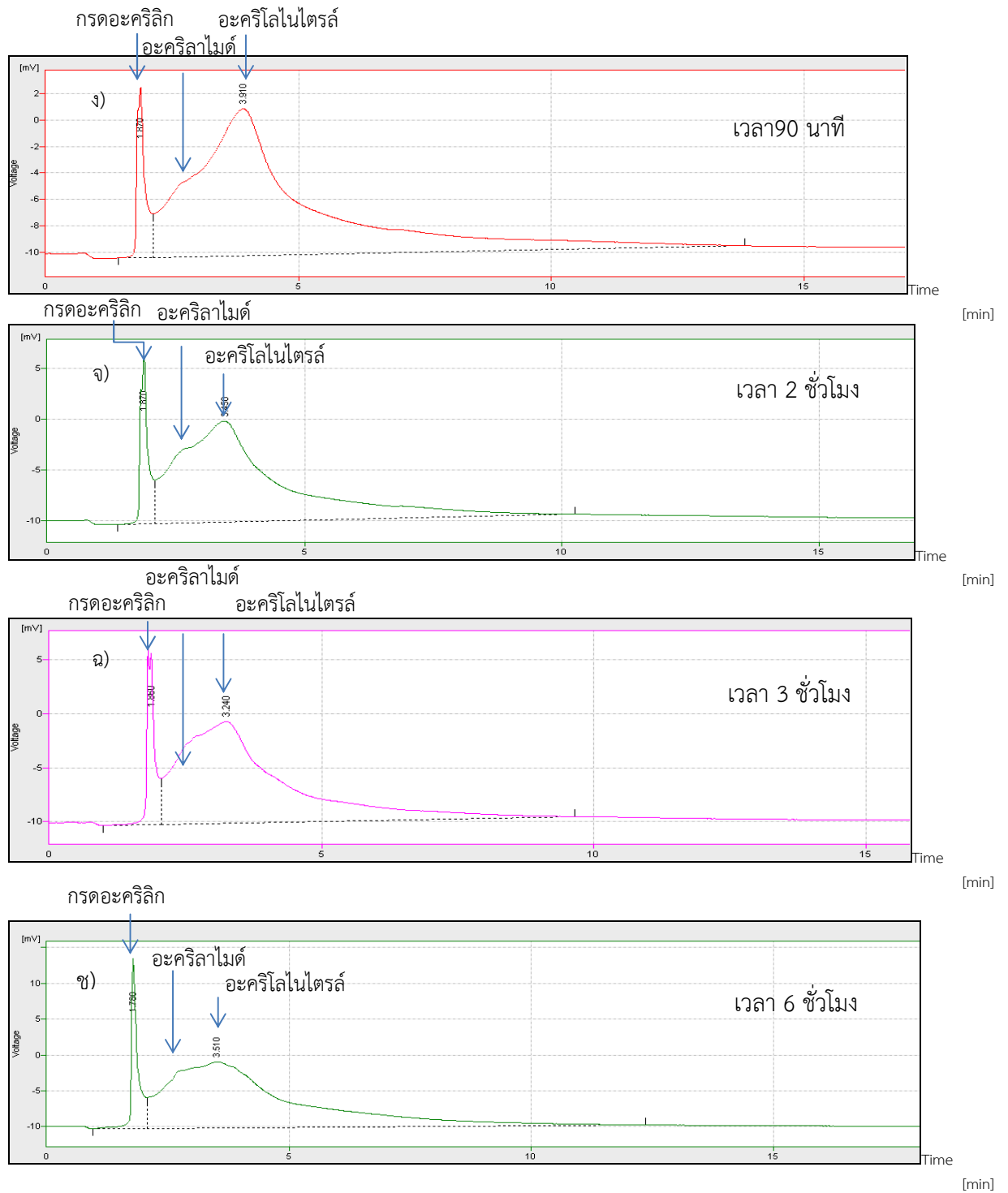


ภาคผนวกที่ 7

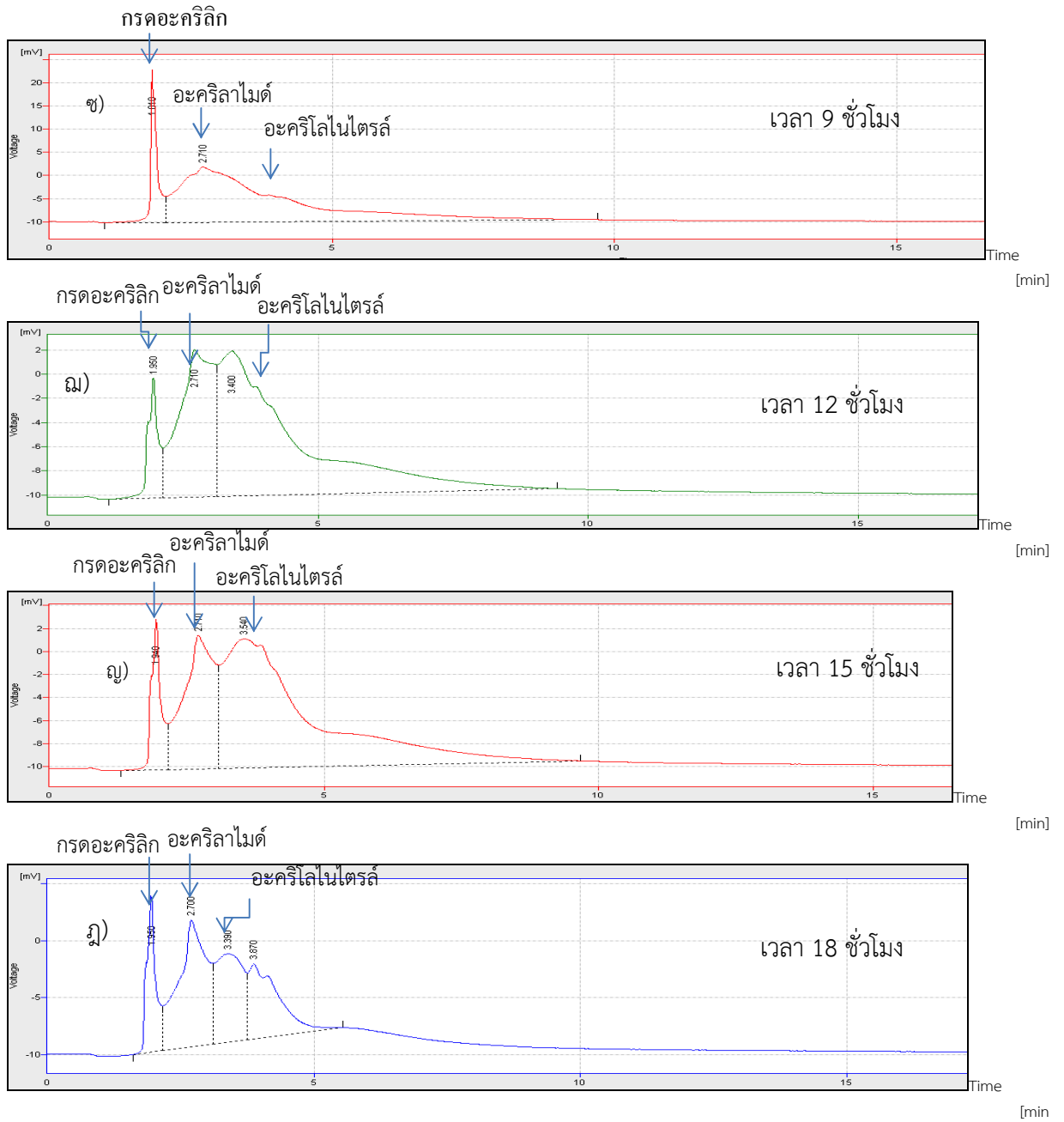
โครมาโทแกรมของการสลายอะคริไลไนไตรล์โดย *Enterobacter aerogenes* ที่เวลาต่างๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



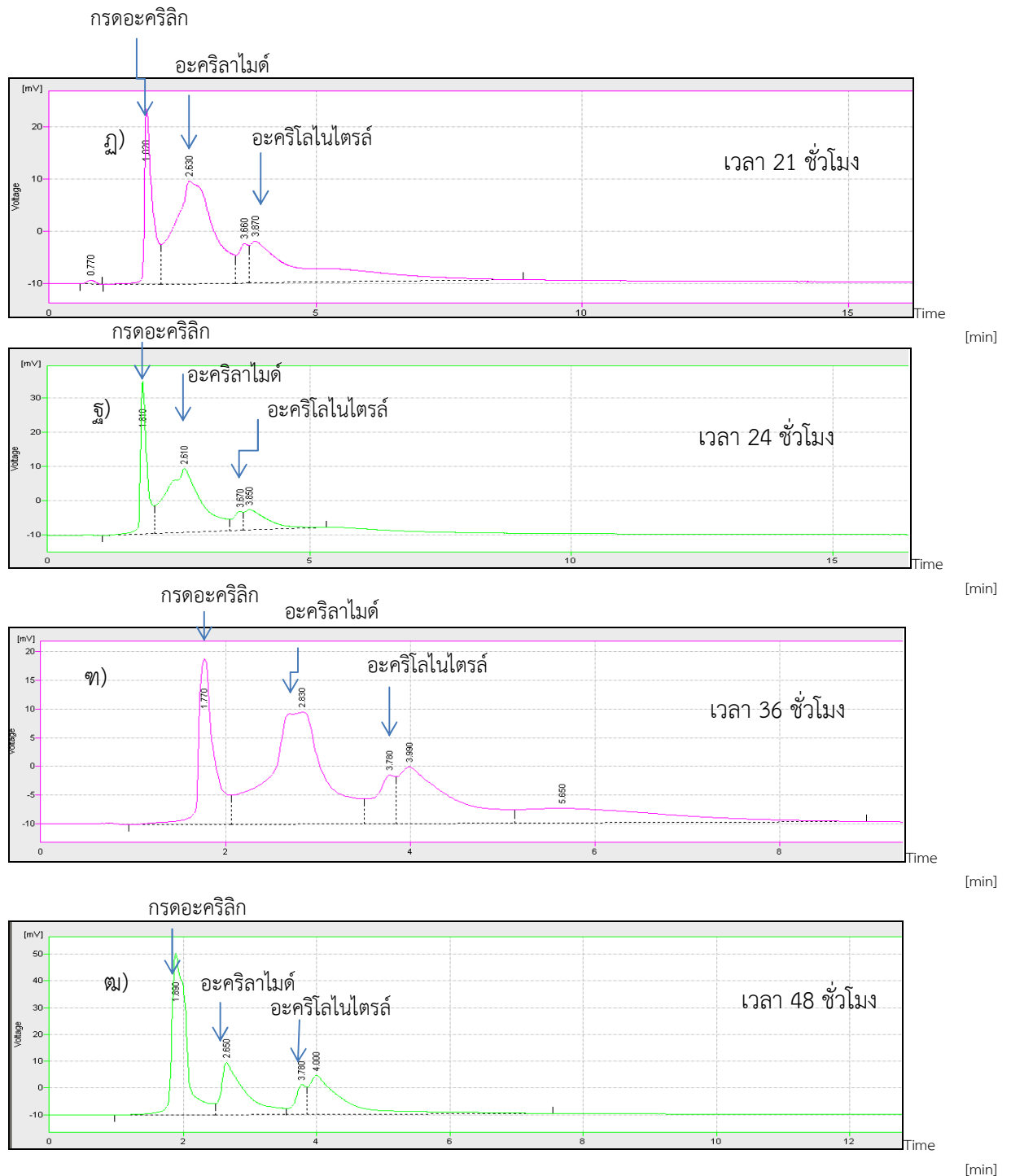
ภาพที่ ผ-6 โครมาโทแกรมของการสลายอะคริไลไนไตรล์โดย *E. aerogenes* ที่เวลาต่างๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ก) ถึง ค) คือ การสลายเมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญเป็นเวลา 0, 30 และ 60 นาที ตามลำดับ



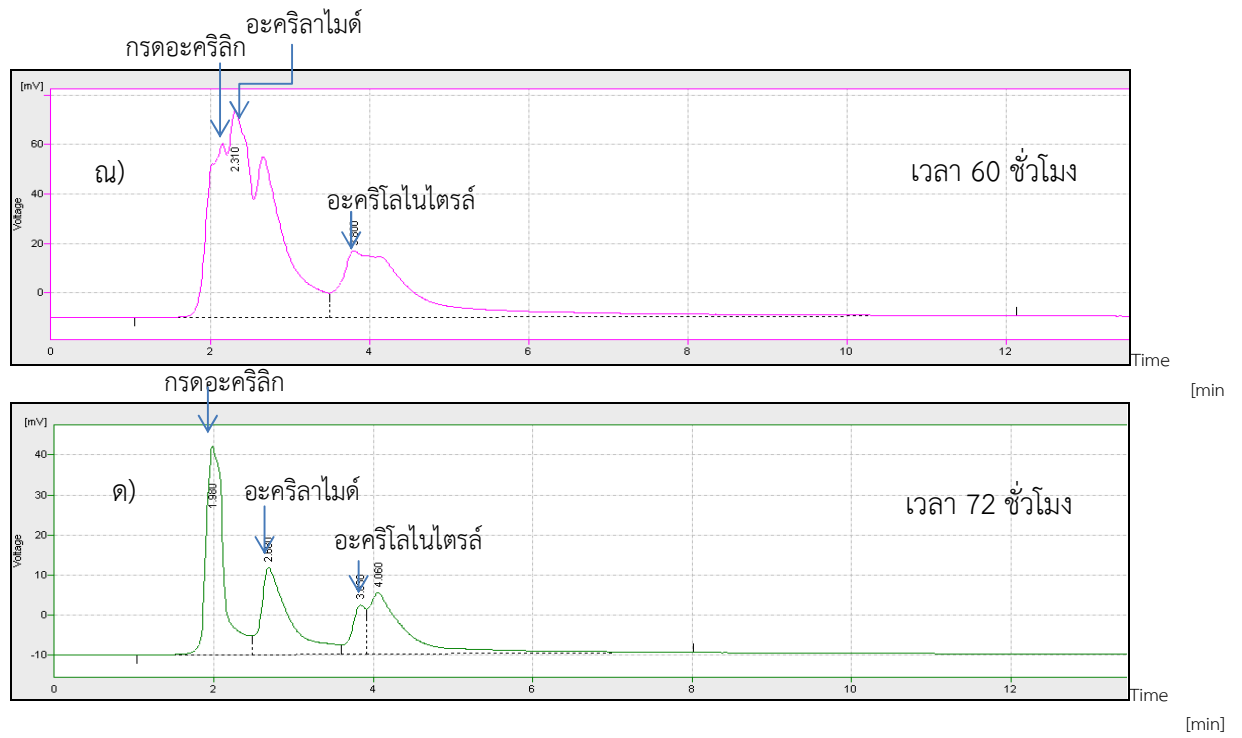
ภาพที่ ๗-7 โครมาโทแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรล์โดย *E. aerogenes* ที่เวลาต่างๆ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC (ง) ถึง (ช) คือ การสลายเมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญเป็นเวลา 90 นาที 2, 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ ผ-8 โครมาโทแกรมของการสลายอะครีโลไนไตรล์โดย *E. aerogenes* ที่เวลาต่างๆ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC (ช) ถึง (ฎ) คือการสลายเมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญเป็นเวลา 9, 12, 15 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ



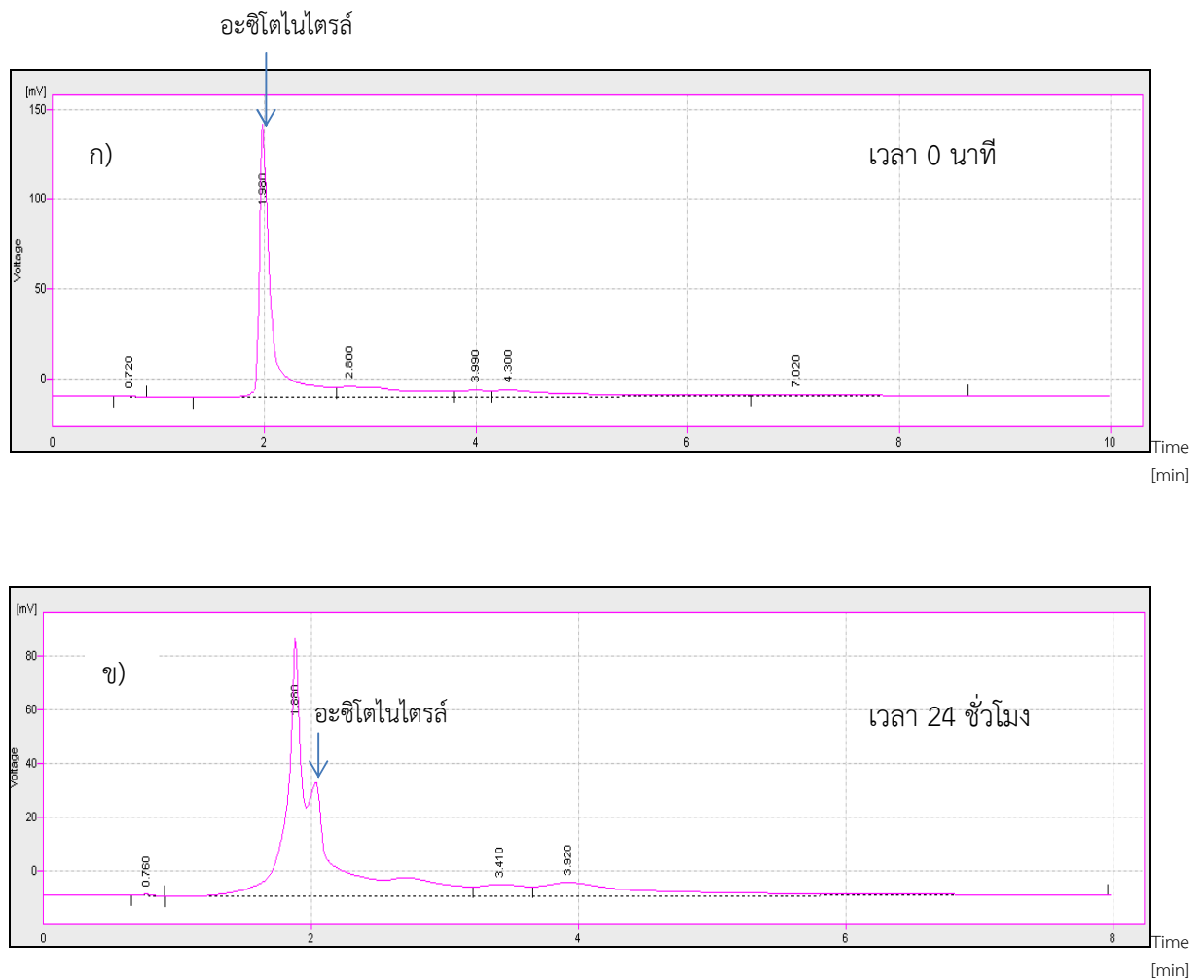
ภาพที่ ๗-9 โครมาโทแกรมของการสลายอะครีโลไนไตรล์โดย *E. aerogenes* ที่เวลาต่างๆ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ก) ถึง ด) คือการสลายเมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญเป็นเวลา 21, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ



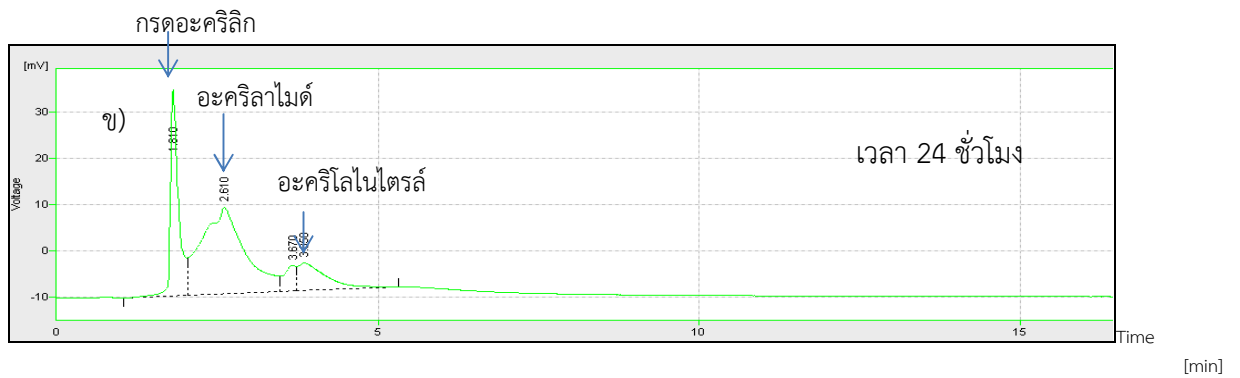
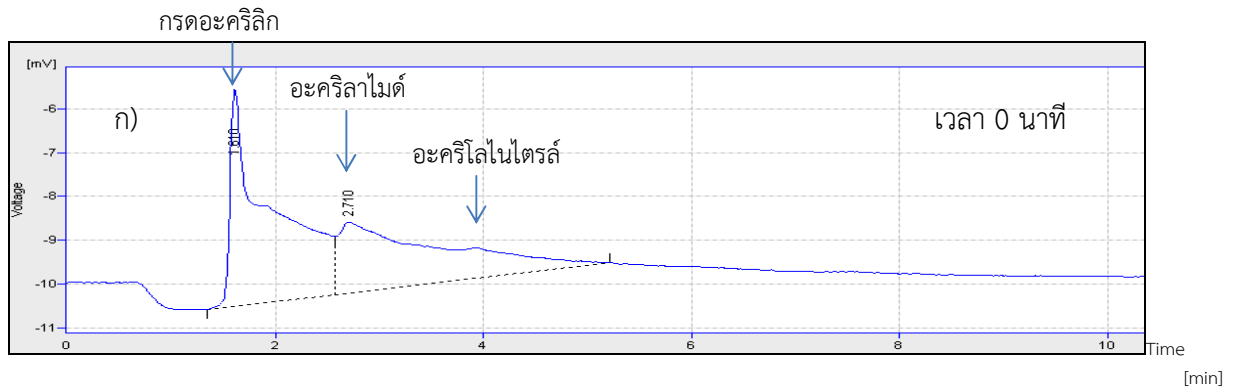
ภาพที่ ผ-10 โครมาโทแกรมของการสลายอะครีโลไนไตรล์โดย *E. aerogenes* ที่เวลาต่างๆ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ณ) ถึง ด) คือการสลายเมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญเป็นเวลา 60 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

ภาคผนวกที่ 8

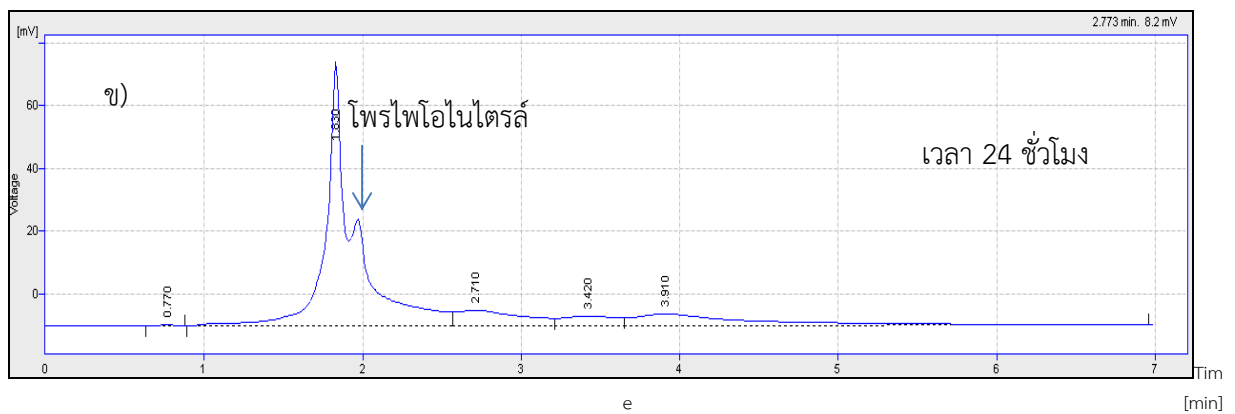
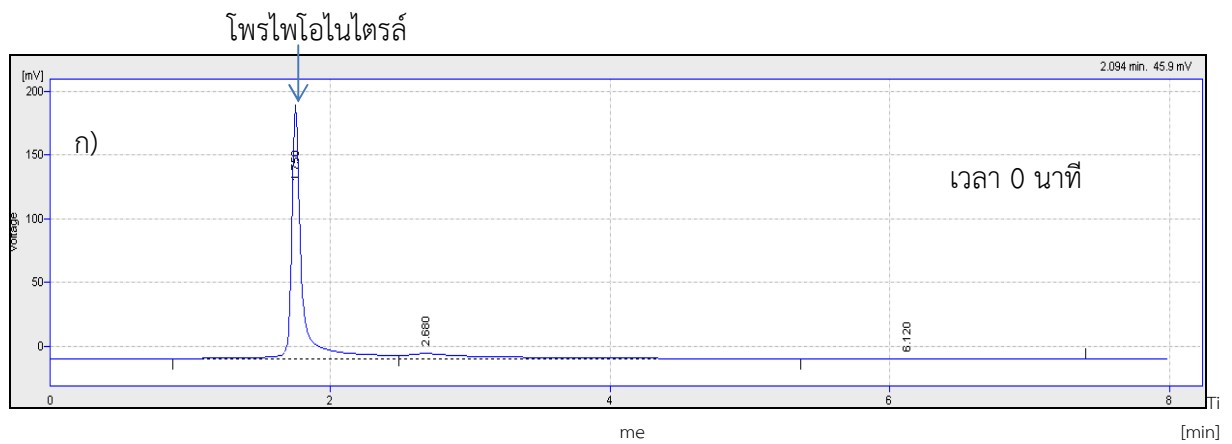
โครมาโทแกรมการสลายสารกลุ่มไนไตรล์โดย *Enterobacter aerogenes* เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC



ภาพที่ ผ-11 โครมาโทแกรมของการสลายอะซิโตไนไตรล์โดย *E. aerogenes* เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญ ก) ที่เวลา 0 นาที และ ข) หลังจากเลี้ยงเจริญ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารอะซิโตไนไตรล์เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ที่เวลา 1.98 นาที เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ในสถานะข้างต้น

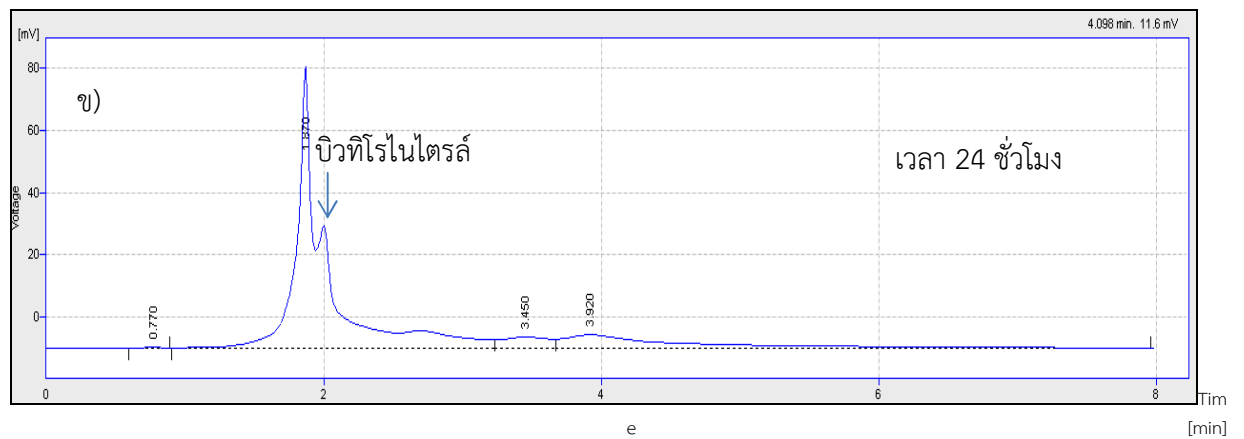
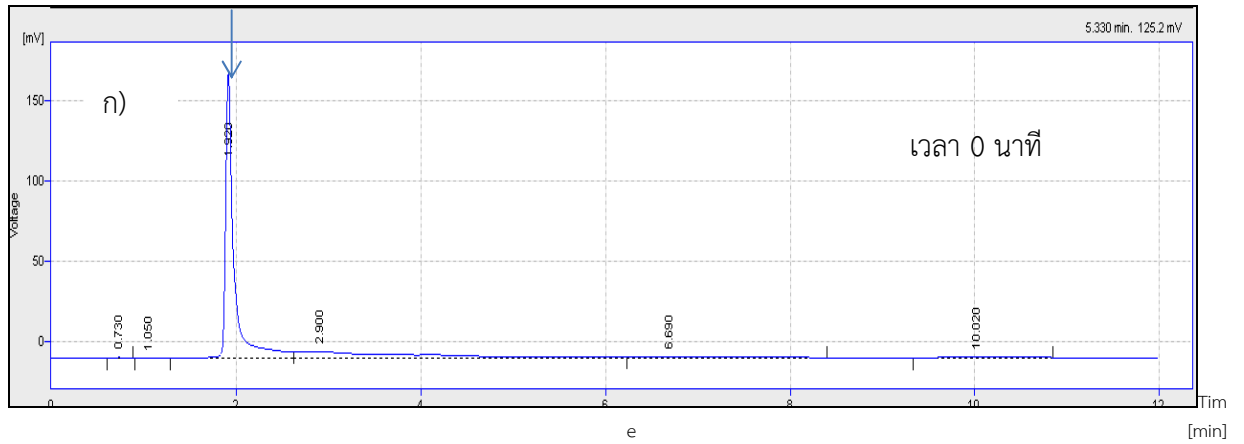


ภาพที่ ผ-12 โครมาโทแกรมของการสลายอะคริโลไนไตรล์โดย *E. aerogenes* เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญ ก) ที่เวลา 0 นาที และ ข) หลังจากเลี้ยงเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารอะคริโลไนไตรล์เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ที่เวลา 3.85 นาที เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ในสภาวะข้างต้น

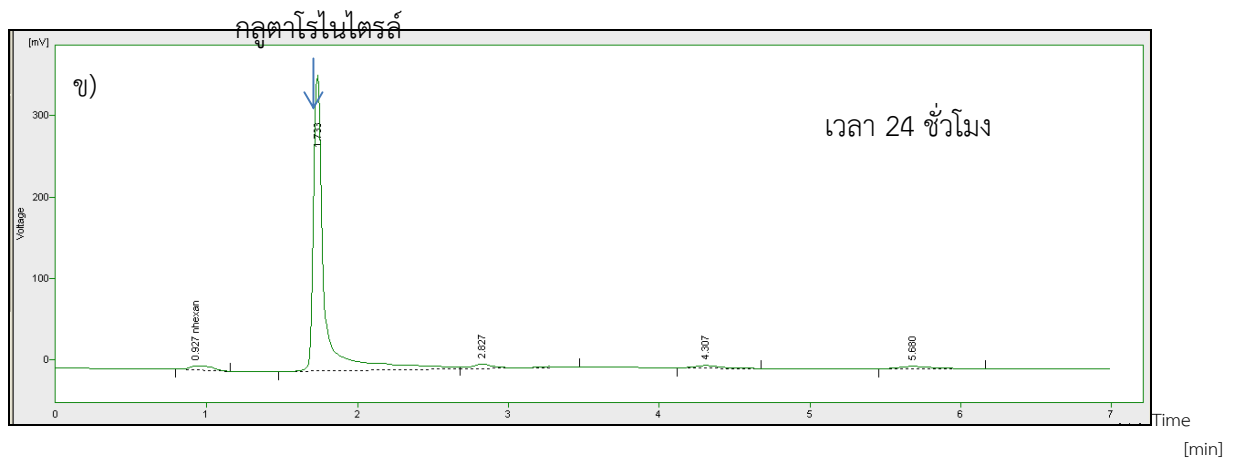
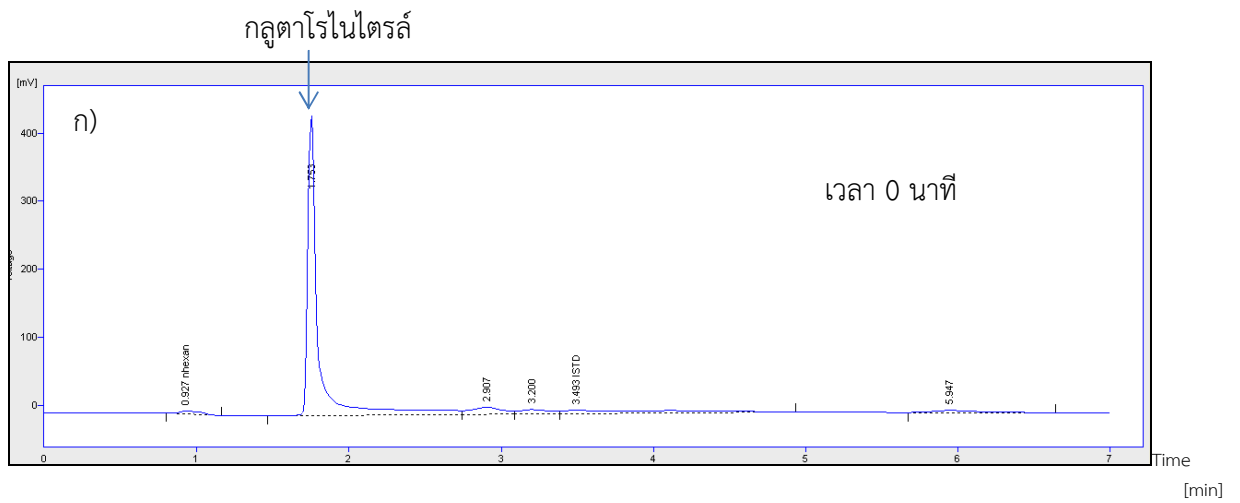


ภาพที่ ๑-13 โครมาโทแกรมของการสลายโพรไฟโอไนไตรล์โดย *E. aerogenes* เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญ ก) ที่เวลา 0 นาที และ ข) หลังจากเลี้ยงเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารโพรไฟโอไนไตรล์เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ที่เวลา 1.75 นาที เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ในสภาวะข้างต้น

บิวทิโรโนไตรล์

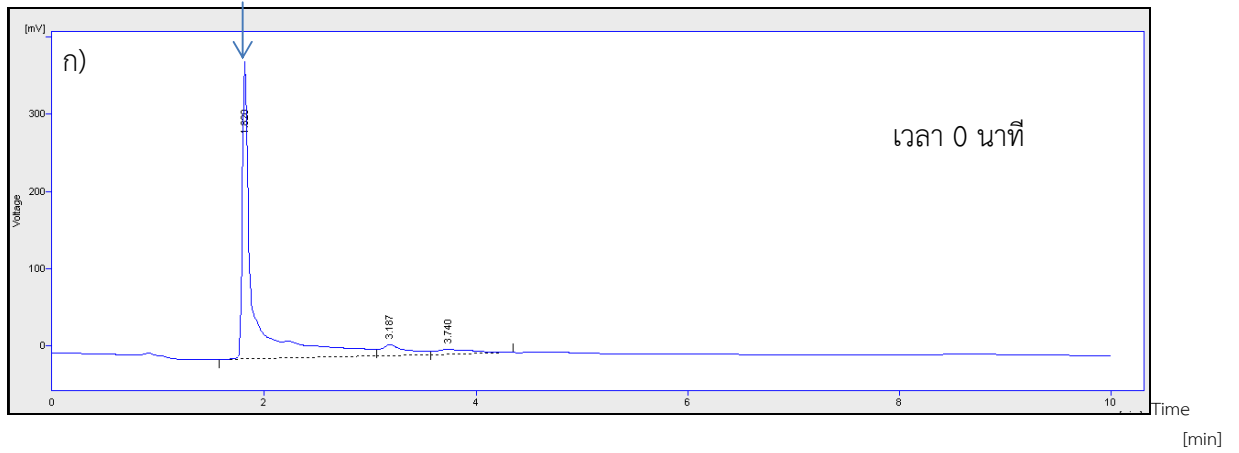


ภาพที่ ๑-14 โครมาโทแกรมของการสลายบิวทิโรโนไตรล์โดย *E. aerogenes* เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญ ก) ที่เวลา 0 นาที และ ข) หลังจากเลี้ยงเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารบิวทิโรโนไตรล์เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์คือที่ 1.92 นาที เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ในสภาวะข้างต้น

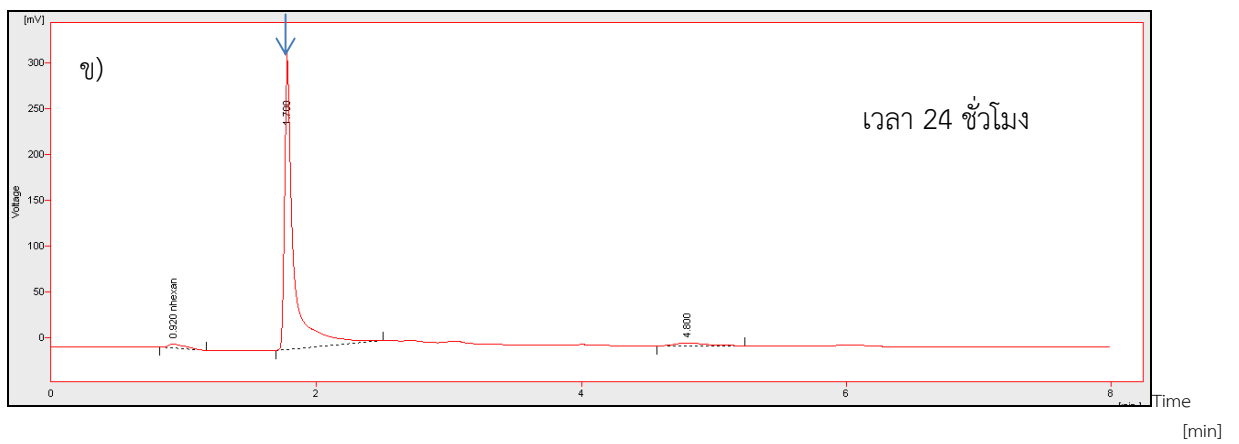


ภาพที่ ผ-15 โครมาโทแกรมของการสลายกลูตาโรไนไตรล์โดย *E. aerogenes* เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญ ก) ที่เวลา 0 นาที และ ข) หลังจากเลี้ยงเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารกลูตาโรไนไตรล์เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ที่เวลา 1.75 นาที เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ในสภาวะข้างต้น

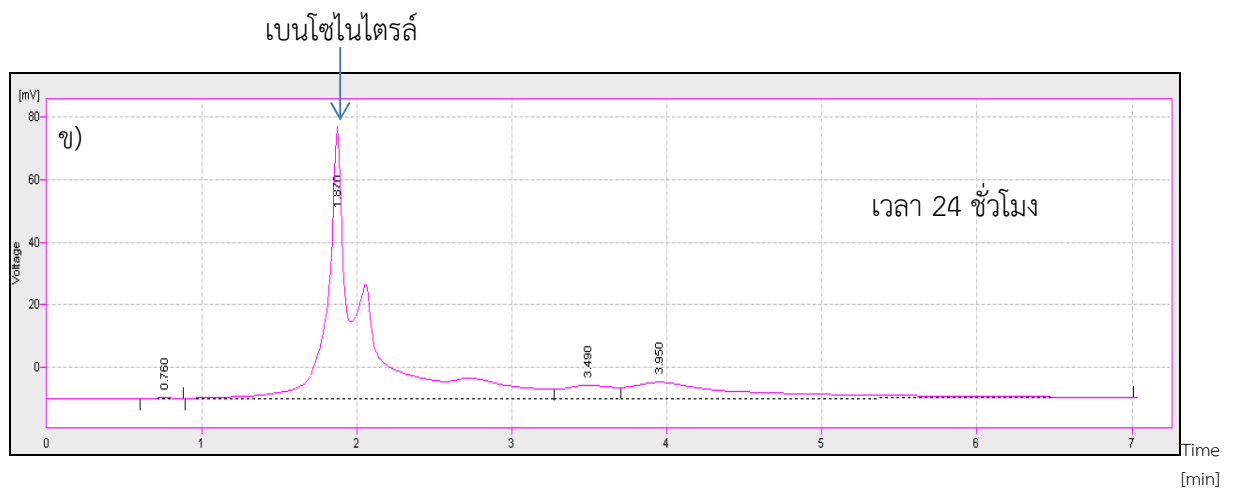
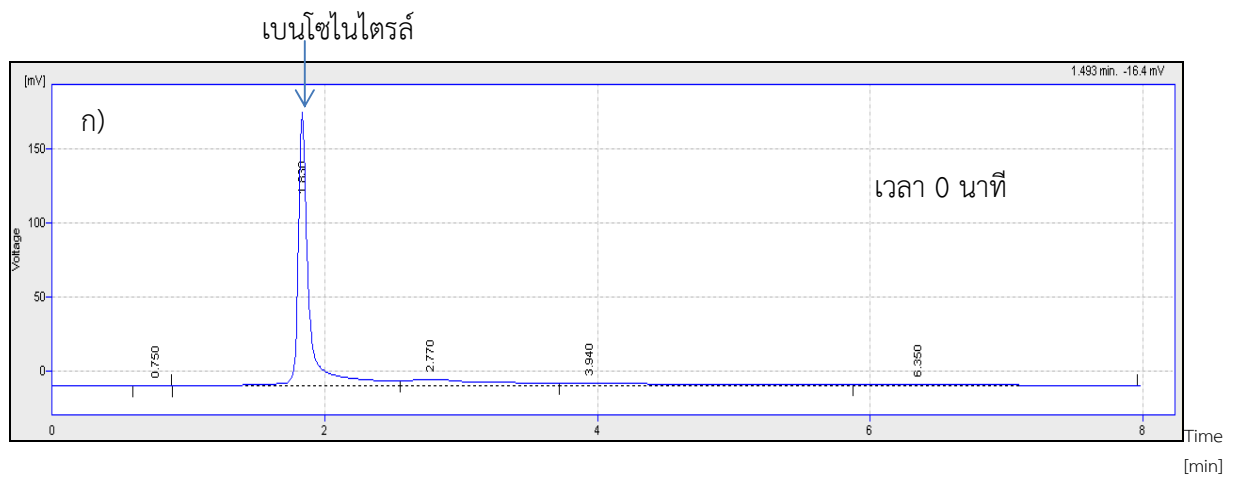
อะดีโพไนไตรล์



อะดีโพไนไตรล์



ภาพที่ ผ-16 โครมาโทแกรมของการสลายอะดีโพไนไตรล์โดย *E. aerogenes* เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญ ก) ที่เวลา 0 นาที และ ข) หลังจากเลี้ยงเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารอะดีโพไนไตรล์เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ที่เวลา 1.82 นาที เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ในสภาวะข้างต้น



ภาพที่ ผ-17 โครมาโทแกรมของการสลายเบนโซอิกโดย *E. aerogenes* เมื่อเลี้ยงเชื้อเจริญ ก) ที่เวลา 0 นาที และ ข) หลังจากเลี้ยงเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารเบนโซอิกเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ที่เวลา 1.83 นาที เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ในสภาวะข้างต้น