บทที่ 1

บทนำ

อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ที่มีสูตรเคมี คือ CH_2=CHCONH$_2$ เป็นสารประกอบอะลิฟาติกเอไมด์ (Aliphatic amide) ซึ่งประกอบด้วยหมู่เอไมด์และพันธะโอเลฟินไม่อิ่มตัวระหว่าง α และ β ที่มีพิษต่อระบบประสาท (Neurotoxin) (Dearfield *et al.*, 1988; Tilson & Cabe, 1979) และมีรายงานว่ามีแนวโน้มสูงที่จะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (Human Carcinogen) (IARC, 1994; Segerback *et al.*, 1995; Tareke *et al.*, 2000) พิษของอะคริลาไมด์เชื่อว่าเกิดจากสารตัวกลางของกระบวนการสลายอะคริลาไมด์ภายในเซลล์ ที่ชื่อว่า ไกล์ซิดาไมด์ (Glycidamide) เข้าจับกับดีเอ็นเอและทำลายรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (Svensson *et al.*, 2003; Tareke *et al.*, 2000)

ในสภาวะโดยทั่วไป สารอะคริลาไมด์มีสถานะเป็นของแข็งโมเลกุลเดี่ยวที่มีสีอ่อนจนถึงสีขาวที่อยู่ในรูปของผลึกที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง สามารถละลายได้ดีในน้ำหรือตัวทำละลายที่มีขั้ว เนื่องจากสารอะคริลาไมด์มีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลเดี่ยว จึงทำให้ง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชั่น (Polymerization) เมื่อถูกหลอมเหลวหรืออยู่ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต อย่างไรก็ตาม สารอะคริลาไมด์สามารถซึมผ่านผิวหนัง เยื่อหุ้มที่มีลักษณะเป็นเมือก (Mucous membranes) ได้แก่ ปอดหรือทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว (Klaasen & Doull, 1986; Merck, 1989) เคยมีรายงานว่า พบสารอะคริลาไมด์ตกค้างในร่างกายของคนงานมากกว่าสองหมื่นคนที่ทำงานในโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้อะคริลาไมด์เป็นสารเคมีในกระบวนการผลิต คาดว่าการตกค้างของสารอะคริลาไมด์นั้น เกิดจากการสัมผัสหรือสูดไอระเหยของสารอะคริลาไมด์เข้าไปในระบบทางเดินหายใจโดยความรู้เท่าไม่ถึงการณ์ (Howard, 1989; IARC, 1986; Kirk-Othmer, 1978) มีรายงานพบว่า เมื่อคนและสัตว์ได้รับสารอะคริลาไมด์เข้าไป จะเกิดความผิดปกติที่ระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทรอบนอก (Klaasen & Doull, 1986; Shanker & Seth, 1986; Tilson, 1981) รวมทั้งส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติต่อการแบ่งเซลล์ในระยะไมโตติก (Mitotic) และไมโอติก (Meiotic) ของสัตว์และพืชบางชนิดอีกด้วย (Shairashi, 1978; Shanker *et al.*, 1987)

จากอดีตจนถึงปัจจุบัน สารอะคริลาไมด์เป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในกระบวนการอุตสาหกรรมไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมน้ำมัน การผลิตกระดาษ หมึกพิมพ์ เครื่องสำอาง และการทำคอนแทคเลนส์ (Kirk-Othmer, 1978; Kirk-Othmer, 1979; Sax & Lewis, 1987; Sittig, 1985) นิยมใช้สารอะคริลาไมด์ในปฏิกิริยาที่ต้องการการสังเคราะห์โพลิเมอร์ (Polymer) หรือการผลิตพลาสติก โดยเป็นสารที่ช่วยในการโพลิเมอร์ไรส์ (Polymerizing

agent) ตัวประสาน (Grouting agent) สารช่วยเพิ่มความเสถียร (Stabilizer) การทำแข็ง (Hardener) การทำความหนา (Thickener) และสารช่วยเพิ่มความแข็งแรง (Strengthener) หรือใช้ในรูปของโพลีเมอร์ที่รู้จักกันดี คือ โพลีอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือโรงงานน้ำมัน (Prasad, 1982) เนื่องจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมต่างๆ ทำให้ในแต่ละปีมีการใช้สารอะคริลาไมด์มากกว่าสองแสนตัน (Nagasawa & Yamada, 1989) จากการใช้อย่างแพร่หลายและไม่มีการควบคุมหรือกำจัดสารอะคริลาไมด์อย่างดีพอ จึงทำให้มีการปนเปื้อนของสารอะคริลาไมด์ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปริมาณสูงถึงร้อยละ 5-0.3 ทำให้เกิดการตกค้างของสารอะคริลาไมด์ในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไป สิ่งแวดล้อมทางทะเล รวมทั้งในระบบนิเวศของพืช (Cherry *et al.*, 1956; Croll *et al.*, 1974; Igisu *et al.*, 1975)

ในอดีตมีรายงานการค้นพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลายสารกลุ่มเอไมด์ได้ ทั้งกลุ่มอะลิฟาติก (Aliphatic) และกลุ่มอะโรมาติก (Aromatic) (Friedrick & Mitrenga, 1981; Grant & Wilson 1973; Hynes & Pateman, 1970; Kagayama & Ohe, 1990) แต่สำหรับสารอะคริลาไมด์นั้น ยังไม่ค่อยมีการค้นพบจุลินทรีย์ที่สามารถใช้อะคริลาไมด์เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญมากนัก ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากผลกระทบของสารอะคริลาไมด์ที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูทาไทโอนเอสทรานส์เฟอเรส (Glutathione-s-transferase) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดสารพิษภายในเซลล์ (Detoxication) โดยการเข้าจับกับหมู่ซัลไฮดริล (Sulfhydryl group) ของเอนไซม์ดังกล่าว (Dixit *et al.*, 1980) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ (Cavins & Friedman, 1968) ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้วิธีการกำจัดการตกค้างของสารอะคริลาไมด์ในอดีตทำได้เพียงแค่การโพลีเมอร์ไรส์อะคริลาไมด์ให้เป็นโพลีอะคริลาไมด์ ซึ่งเป็นรูปที่ไม่มีพิษ แต่จากข้อจำกัดของปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชั่นที่ต้องใช้สารเคมีเพิ่มเติมที่มีราคาแพง เช่น แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulphate) และทีเมด (*N, N, N', N'*-Tetramethylenediamine; TEMED) สำหรับให้อนุมูลอิสระในการเริ่มต้นของปฏิกิริยาและเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชั่น 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 และคณะฯ ได้ทำการคัดเลือก *Pseudomonas chlororaphis* B23 จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของอะคริลาไมด์ ทำให้หลังจากนั้นได้มีการค้นพบและศึกษาคุณสมบัติในการสลายสารอะคริลาไมด์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

หลากหลายมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นใน *Rhodococcus rhodocrhous* 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)

กลไกการสลายอะคริลาไมด์เริ่มต้นโดยอาศัยปฏิกิริยาดีอะมิเดชั่น (Deamidation) จากการทำงานของเอนไซม์อะมิเดส (Amidase) หรือที่รู้จักกันดีว่าเอนไซม์อะมิโดไฮโดรเลส (Amidohydrolase; EC 3.5.1.4) เปลี่ยนอะคริลาไมด์เป็นแอมโมเนียและกรดอะคริลิก (Acrylic acid) หรือที่รู้จักในชื่ออะคริเลต (Acrylate) (Nawaz *et al.*, 1998, Nawaz *et al.*, 1994, Shanker *et al.*, 1990, และ Sluis *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีพิษน้อยลงและไม่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต (Verschueren, 1977) ที่จะถูกสลายต่อไปโดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสลายอะคริเลต (Acrylate catabolism) ที่มีอยู่เองในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้น เช่น เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชั่น (Hydroxylation) เป็นบีตา-ไฮดรอกซีโพไพโอเนท (β-hydroxypropionate) ที่จะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ หรือเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น (Reduction) เป็นโพรไพโอเนท (Propionate) โดยการทำงานของเอนไซม์กลุ่มอะคริลิกเอซิดรีดักเทส (Acrylic acid reductase) เป็นต้น (จิตติมา เจริญพานิช, 2551; Wampler & Ensign, 2005)

ปัจจุบัน ในหลายประเทศมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ หรือเซลล์ตรึงของจุลินทรีย์ (Immobilized cells) ในการสลายสารตกค้างจากกระบวนการอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาไม่นานและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบในภายหลัง สำหรับการกำจัดสารอะคริลาไมด์ เคยมีรายงานเช่นกันถึงการนำเอนไซม์อะมิเดสบริสุทธิ์ หรือ เซลล์ตรึงของแบคทีเรียที่ใช้อะคริลาไมด์ในการเจริญ มาล้างพิษอะคริลาไมด์ที่ตกค้างในกระบวนการอุตสาหกรรม โดยการเลี้ยงเซลล์ตรึงของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะคริลาไมด์ คือผลิตเอนไซม์อะมิเดสในถังพักน้ำของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม (Nawaz *et al.*, 1993; Nawaz *et al.*, 1998; Prabu & Thatheyus, 2007; Wang & Lee, 2001) แต่ทั้งนี้ ประสิทธิภาพในการสลายสารอะคริลาไมด์ของจุลินทรีย์ก็ยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็น ความสามารถของจุลินทรีย์ที่จะดัดแปลงตัวเองให้สามารถเจริญในสภาวะแวดล้อมที่ต่างออกไป เช่น ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง สภาวะที่มีความเป็นกรดหรือด่าง สภาวะที่มีโลหะตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารพิษบางชนิดปนเปื้อน และปัญหาในเรื่องของการควบคุมการแพร่กระจายของจุลินทรีย์จากระบบบำบัดลงสู่แหล่งน้ำข้างเคียง ขณะเดียวกันการใช้เอนไซม์อะมิเดสในการสลายอะคริลาไมด์ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้า (Nawaz & Yamada, 1989; Shanker et al., 1990; Nawaz et al., 1994; Nawaz et al., 1998) ก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องต้นทุนการผลิตเอนไซม์อะมิเดสบริสุทธิ์ที่จะนำมาใช้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการนำเข้าจากต่างประเทศ รวมทั้งเมื่อสลายด้วยเอนไซม์อะมิเดสแล้ว จำเป็นต้องมีการแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์กรดอะคริลิกที่ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สิ้นเปลืองอีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีเป้าหมายที่จะผลิต

เอนไซม์อะลิฟาติกอะมิเดสปริมาณสูง สำหรับใช้ในการสลายอะคริลาไมด์อย่างสมบูรณ์ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโคลนยีนของเอนไซม์อะลิฟาติกอะมิเดสจากแบคทีเรียที่สามารถใช้ประโยชน์อะคริลาไมด์ ที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera ascorbata* และ *Enterobacter aerogenes* เป็นต้น (จิตติมา เจริญพานิช, 2551; Buranasilp *et al.*, 2009; Buranasilp & Charoenpanich, 2011; Thanyacharoen *et al.*, 2011) และดัดแปลงให้เกิดการแสดงออกปริมาณมาก จากนั้นจึงทำการตรึงรูป (Immobilization) เอนไซม์ที่ได้จากการแสดงออก เพื่อนำมาใช้ซ้ำสำหรับกระบวนการสลายอะคริลาไมด์และการผลิตกรดอะคริลิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ซึ่งโครงงานวิจัยฉบับนี้เป็นปีที่ 1 ของโครงงานวิจัยตามแผนวิจัย 3 ปี โดยในปีนี้จะมุ่งเป้าไปที่การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะลิฟาติกอะมิเดส จากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการสลายอะคริลาไมด์เป็นกรดอะคริลิกที่คัดเลือกได้จากแบคทีเรียสลายอะคริลาไมด์ที่มีในห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 01 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 247392
เลขเรียกหนังสือ