บทนำ

พลาสติกสังเคราะห์ เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นขยะ ถ้าไม่มีการจัดการที่ดี จะทำให้เกิดการกักขังของน้ำในดิน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้น้ำไม่ไหล เกิดน้ำท่วมได้ หรือก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนอย่างหนักในแหล่งแม่น้ำ ทะเลที่อยู่ใกล้เคียง (Rutkowska et al., 2003) นอกจากนี้ การสะสมของพลาสติกสังเคราะห์ในดิน ยังมีผลทำให้ผลผลิตการเกษตรลดลง สัตว์และปลาต่างๆ ตายได้ เนื่องจากกลืนเอาชิ้นส่วนของพลาสติกสังเคราะห์เข้าไป สิ่งต่างๆเหล่านี้มีผลต่อการทำลายระบบนิเวศน์เป็นอย่างมาก (Yang et al., 2004) การนำพลาสติกกลับมาใช้ใหม่ มิใช่เป็นการประหยัดเนื่องจากสมบัติเดิมของพลาสติกด้อยลงกว่าเดิมและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก ดังนั้นพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติหรือไบโอพลาสติก (bioplastic) จะสามารถแก้ปัญหาการเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี โดยเราสามารถจำแนกขยะของพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติเป็นประเภทเดียวกับขยะที่เป็นอาหาร ซึ่งเป็นการลดปริมาณขยะที่เป็นของแข็ง (Yang et al., 2004)

Poly (hydroxyalkanoate(s)) (PHA(s)) เป็นพลาสติกที่ทนความร้อน (thermoplastic) ถูกย่อยสลายตามธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์ ไบโอพลาสติกหรือโพลีเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายกันกับ PHA คือ polyhydroxybutyrate (PHB) (Lemoigne, 1926) PHA ถูกพบได้ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ทะเลสาบ (Esteve et al., 1996, Guerrero et al., 1985, Mas-Castella and Guerrero, 1995, Pedros-Alio et al., 1990; van Gemerden et al., 1985) แม่น้ำ (Freeman et al., 1993; Lopez *et al.*, 1995) ปมของรากพืช (Karr et al., 1983; Ndoye et al., 1994) ตะกอนใต้ท้องทะเลลึกที่มีอุณหภูมิสูง (Guezennec et al., 1998) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบได้ใน activated sludge (Mino et al., 1998; Wentzel et al., 1991) PHA ถูกสะสมอยู่ภายในเซลล์ในรูปของ inclusion bodies สามารถพบได้ถึง 90% ของน้ำหนักแห้ง (Jendrossek, 1998) กลุ่มสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอตส่วนใหญ่มักจะสะสม PHA และ PHB ในรูปที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในไซโตพลาสซึม และพบว่าการสะสม PHA ทำให้แบคทีเรียมีการอยู่รอดในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร (Matin et al., 1979)

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำและสภาพแวดล้อมที่มีสภาพแห้งตามธรรมชาติบางแห่ง สามารถใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน มีเม็ดสีคล้ายกับที่พบในพืชสีเขียว ได้แก่ chlorophylls, phycobilins, แคโรทีนอยด์ (carotenoids) (Eraso and Kaplan, 2001) สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความต้องการออกซิเจน คือ พวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน ในกระบวนการเมแทโบลิซึม (metabolic process) หรือ anoxygenic photosynthetic bacteria ได้แก่ purple bacteria (*Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae* และ purple nonsulfur bacteria) และ green bacteria (green sulfur bacteria และ multicellular filamentous green bacteria) และพวกที่ต้องการออกซิเจนในกระบวนการเมแทโบลิซึม หรือ oxygenic photosynthetic bacteria ได้แก่ cyanobacteria และ prochlorophytes (Imhoff and Truper, 1989) มีรายงานการค้นพบ PHA ใน cyanobacteria ที่เจริญอยู่ในทะเลและน้ำสะอาด (fresh water) (Capon et al., 1983) และพบใน *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*

(Zhang et al., 2004) และรายงานการค้นพบในแบคทีเรียชนิด purple nonsulfur ได้แก่ *Rhodopseudomonas palustris* (de Phillippis et al., 1992; Sawayama et al., 2000; Sawayama et al., 2001; Carlozzi and Sacchi, 2001) *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ SP5212 (Mukhopadhyay et al., 2005) รวมถึง *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 แต่มีการสร้าง PHA ที่ต่ำประมาณ 15% (w/w) ของน้ำหนักแห้ง (Tanskul et al., 2007) *Rps. palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 นี้ถูกแยกได้จากมูลไก่ ซึ่งเป็นไปได้ที่จะเจริญในน้ำทิ้งที่ประกอบด้วยอินทรีย์สาร ประกอบกับความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเนสได้ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้ง นอกจากนี้ยังมีรายงานเชื้อชนิดนี้แต่ต่างสายพันธุ์ ที่สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ (Carlozzi and Sacchi, 2001) ซึ่งแก๊สไฮโดรเจนนี้ถูกคาดหวังให้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในอนาคต รวมถึงความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบที่ย่อยยาก คือ chlorinated benzoic acids (Oda et al., 2004) ดังนั้น *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 จึงเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจในการใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาด้านต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น

การควบคุมการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมของ PHA มีลักษณะซับซ้อน ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก เช่น การควบคุมการทำงานของ PHA synthesizing genes หรือ PHA synthase genes ที่เป็นผลจากการขาดแคลนอาหาร ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ หรือสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทโบลิซึม (metabolic intermediates) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHA ตลอดจนการยับยั้งของเอนไซม์ชนิดอื่นที่เข้ามาเกี่ยวข้องหรือใช้สารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic intermediates) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHA ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้อาจเกิดร่วมกันได้ (Kessler and Witholt, 2001)

เป็นที่ทราบกันดีว่าการควบคุมการสร้าง PHA เป็นผลเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ (Senior and Dawes, 1971) รวมถึงปริมาณความเข้มข้นของ acetyl-CoA และ coenzyme A ภายในเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการสร้างโพลีเมอร์ (Haywood et al., 1988; Mothes et al., 1997) ชนิดของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ β-ketothiolase และ acetoacetyl-CoA reductase โดยเฉพาะ β-ketothiolase ซึ่งมีบทบาทในการทำให้ acetyl-CoA รวมกัน นอกจากนี้ยังพบว่า PHA synthase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำให้เกิด polymerization ของ (R)-3-hydroxyacyl-CoA (Rehm, 2003) PHA synthase ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัย subunits และ substrate specificity ที่แตกต่างเป็นเกณฑ์ในการแบ่ง มีการค้นพบ PHB synthase ที่ได้จาก extremely halophilic archaebacterium ซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์ตัวใหม่ในกลุ่ม synthase โดยสามารถคงตัวอยู่ได้ที่ 60°C โดยที่กิจกรรมยังคงอยู่ถึง 90% (Hezayen et al., 2002) PHA synthases เป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่เร่งการเกิดโพลีเมอร์ (polymerization) ของ coenzyme A thioester derivatives ของ hydroxyalkanoic acids (HACoAs) ที่จะผลิต PHAs ต่อไป โดยจะปลดปล่อย CoA ออกมาในระหว่างการผลิต พบว่าปริมาณ PHA synthases มีผลต่อการผลิต PHA อย่างเป็นนัยสำคัญทั้งในสิ่งมีชีวิตหรือในหลอดทดลอง (Zhang et al., 2004) ซึ่งถูกควบคุมการทำงานโดย PHA synthase genes

PHA synthase genes และยีนที่ถอดรหัสโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับเมแทบอลิซึมของ PHA มักอยู่ด้วยกันในจีโนมของแบคทีเรีย (Rehm and Steinbuchel, 1999; Rehm and Steinbuchel, 2001) ตัวอย่าง

ใน *Ralstonia eutropha* มียีนสำหรับ class I PHA synthase (*phaC*) β-ketothiolase (*phaA*) และ NADP-dependent acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*) (Steinbuchel and Schlegel, 1991) ซึ่งเป็นส่วนประกอบอยู่ใน *phaCAB* operon (Slater et al., 1988; Schubert *et al.*, 1988; Peoples and Sinskey, 1989) ซึ่งอาจมีการเรียงลำดับของยีนต่างๆ แตกต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละชนิด PHA synthases เป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่เร่งการเกิดโพลีเมอร์ (polymerization) ของ coenzyme A thioester derivatives ของ hydroxyalkanoic acids (HACoAs) ที่จะผลิต PHAs ต่อไป โดยจะปลดปล่อย CoA ออกมาในระหว่างการผลิต พบว่าปริมาณ PHA synthases มีผลต่อการผลิต PHA อย่างเป็นนัยสำคัญทั้งในสิ่งมีชีวิตหรือในหลอดทดลอง (Zhang et al., 2004) ซึ่งถูกควบคุมการทำงานโดย PHA synthase genes ซึ่งในการศึกษา PHA synthase genes นี้ มีรายงานการศึกษาใน purple nonsulfur bacteria ชนิด *Rhodobacter sphaeroides* FJ1 โดยทำให้ส่วนของ *phaC* gene ถูกเพิ่มจำนวนได้โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) conserved regions ของ *phbC* gene ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ กล่าวคือ forward primer เป็น UHCl, 5′-GGAATTCGTGGGT(C/G)AA(C/T)CC(C/G)GA-3′) และ reverse primer เป็น (LHCL), 5′-CGGGATCCA(C/G)GG(C/G)(A/G)CGATATGGTC-3′) (Yang et al., 2006)

การผลิต PHA โดยการลดค่าใช้จ่ายลง สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูกของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม วัสดุเหลือใช้ทางเกษตรกรรม เป็นต้น ในการเพิ่มการผลิตผลิตภัณฑ์สามารถทำได้โดยใช้ลูกผสมของ *E.coli* (recombinant *Escherichia coli* (Khanna and Srivastava, 2005; Madison and Huisman, 1999) *E.coli* เป็นผู้อาศัยที่เหมาะสมในการแสดงออกของยีนที่แปลกปลอมเข้ามา กล่าวคือง่ายต่อการควบคุมและพัฒนาการสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ *E.coli* ยังถูกเลี้ยงได้ง่ายและเพิ่มจำนวนได้มาก (Lee, 1996; Shiloach and Fass, 2005) และยังพบว่าถ้า *E.coli* มีการสะสม PHB จำนวนมากแล้วเซลล์จะแตกง่ายทำให้สะดวกต่อการแยก PHB ออกจากตัวเซลล์ และการทำให้ PHB บริสุทธิ์ นอกจากนี้ *E.coli* ไม่สร้างเอนไซม์ที่จะมาย่อย PHA ได้ มีรายงานการโคลนยีน *phbC* จาก *Alcaligenes eutrophus* เข้าไปใน *E. coli* พบว่า *E.coli* ลูกผสมนี้มีการสร้าง PHA มากและสร้างตลอด (constitutive expression) (Peoples and Sinskey, 1989; Schubert et al., 1988; Slater et al., 1988) รวมถึงรายงานการพัฒนาระบบของ ผู้ให้อาศัย-พลาสมิด (host-plasmid) และกลยุทธในการทำให้มีการผลิต PHB ในปริมาณที่มาก (Janes et al., 1990; Kim et al., 1992; Lee et al., 1994a; Lee et al., 1994b; Lee et al., 1994c) และมีรายงานการโคลนยีนที่สร้าง PHA synthase เข้าไปยังใน *Alcaligenes eutrophus* โดยนำยีนจากกลุ่ม purple sulfur bacteria คือ *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* (Liebergesell *et al.*, 1993) จากกลุ่ม purple non-sulfur bacteria ได้แก่ *Rhodobacter sphaeroides* (Hustede et al., 1992) *Rhodospirillum rubrum* (Hustede et al., 1992) แต่ไม่มีรายงานการโคลนยีนจาก *Rhodopseudomonas palustris* หรือ *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 เข้าไปยังในเซลล์ผู้ให้อาศัยที่เป็น *E. coli*

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการทำเซลล์ *E. coli* BL21 ให้เป็นเซลล์ลูกผสมที่ประกอบด้วย PHA synthase gene (s) จาก *Rps. palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 และศึกษาความสามารถในการสร้าง PHA ในสภาวะต่างๆ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- เพื่อทำการโคลน PHA synthase gene(s) เข้าไปยังเซลล์ *E. coli* BL21
- เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PHA synthase gene
- เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของเซลล์ *E. coli* BL21 ลูกผสม

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ทำการโคลน PHA synthase gene(s) จาก *Rps. palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288
- หาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ PHA synthase gene (s)
- ถ่ายฝาก PHA synthase gene (s)เข้าไปยัง *E. coli* BL21
- ทดสอบการแสดงออกของ PHA synthase gene(s) และหาค่ากิจกรรมของ PHA synthase
- ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

พลาสติกสังเคราะห์ ก่อให้เกิดเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ เนื่องจากย่อยสลายได้ยากและใช้เวลานาน ดังนั้นทางเลือกใหม่ของการใช้พลาสติก คือ ควรเป็นพลาสติกที่ย่อยได้ตามธรรมชาติหรือ ไบโอพลาสติก ที่รู้จักกันดีคือ Poly (hydroxyalkanoate(s)) (PHA(s)) เป็นพลาสติกที่ทนความร้อน (thermoplastic) ถูกย่อยสลายตามธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์ หรือโพลีเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายกันกับ PHA คือ polyhydroxybutyrate (PHB) (Lemoigne, 1926) PHA ถูกพบได้ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ มีรายงานการค้นพบในแบคทีเรียชนิด purple nonsulfur ได้แก่ *Rhodopseudomonas palustris* (de Phillippis et al., 1992; Sawayama et al., 2000; Sawayama et al., 2001; Carlozzi and Sacchi, 2001) *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ SP5212 (Mukhopadhyay et al., 2005) รวมถึง *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 แต่มีการสร้าง PHA ที่ต่ำประมาณ 15% (w/w) ของน้ำหนักแห้ง (Tanskul et al., 2007) ดังนั้น *Rhodopseudomonas palustris* สายพันธุ์ NCIB 8288 ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ จึงเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจต่อการปรับปรุงให้มีการผลิต PHA ที่สูงขึ้น

การควบคุมการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมของ PHA มีลักษณะซับซ้อน ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก เช่น การควบคุมการทำงานของ PHA synthesizing genes หรือ PHA synthase genes ยีนที่ถอดรหัสโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับเมแทบอลิซึมของ PHA มักอยู่ด้วยกันในจีโนมของแบคทีเรีย (Rehm and Steinbuchel, 1999; Rehm and Steinbuchel, 2001) การผลิต PHA โดยการลดค่าใช้จ่ายลง สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก ของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม วัสดุเหลือใช้ทางเกษตรกรรม เป็นต้น ในการเพิ่มการผลิตผลิตภัณฑ์ สามารถทำได้โดยใช้ลูกผสมของ *E.coli* (recombinant *Escherichia coli* (Khanna and Srivastava, 2005; Madison and Huisman, 1999) *E.coli* เป็นผู้อาศัยที่เหมาะสมในการแสดงออกของยีนที่แปลกปลอมเข้ามา กล่าวคือง่ายต่อการควบคุมและพัฒนาการสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ *E.coli* ยังถูกเลี้ยงได้ง่ายและเพิ่มจำนวนได้มาก (Lee, 1996; Shiloach and Fass, 2005) และยังพบว่าถ้า *E.coli* มีการสะสม PHB จำนวนมากแล้ว เซลล์จะแตกง่ายทำให้สะดวกต่อการแยก PHB ออกจากตัวเซลล์ และการทำให้ PHB บริสุทธิ์ นอกจากนี้ *E.coli* ไม่สร้างเอนไซม์ที่จะมาย่อย PHA ได้