

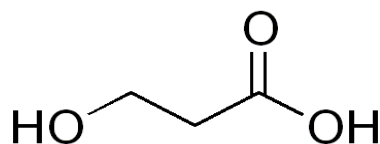
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติและความสำคัญของ 3-hydroxypropionic acid

2.1.1 คุณสมบัติของ 3-hydroxypropionic acid

3-hydroxypropionic acid (3-HP) สูตรเคมีคือ $C_3H_6O_3$ (MW 90.08; CAS Registry Number 503-66-2; pK_a 4.51; density 1.08) (ภาพที่ 2.1) จัดเป็น carboxylic acid ที่มี β -hydroxyl group ที่เฉพาะ มีโครงสร้างที่เป็นไอโซเมอร์ของ lactic acid (2-hydroxypropanoic acid) ลักษณะเป็นของเหลว สามารถละลายได้ในน้ำ เมทานอล และอีเทอร์ มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส และไม่มีกลุ่มเมทิลเป็นองค์ประกอบ (Jiang และคณะ, 2009) ซึ่งกลุ่มเมทิลนี้จะส่งผลให้ความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนน้อยลง นอกจากนี้โครงสร้างของสารยังประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเบตา ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้ 3-hydroxypropionic acid จึงมีความแข็งแรงทนทานและเป็นสารตัวแทนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอื่น ๆ ได้อย่างหลากหลาย ในอุตสาหกรรมเคมีมีการใช้งานที่หลากหลาย อาทิเช่น ใช้เป็นสารเชื่อมขวาง (crosslinking agent) สำหรับเคลือบพอลิเมอร์ สารหล่อลื่นโลหะ และสารต้านไฟฟ้าสถิต (antistatic agent) สำหรับสิ่งทอ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เคมีภัณฑ์ที่มีคุณค่าในเชิงพาณิชย์จำนวนมาก อาทิเช่น 1,3-propanediol (1,3-PDO: $C_3H_8O_2$ -MW 76.09), malonic acid ($C_3H_4O_4$ -MW 104.06), acrylic acid ($C_3H_4O_2$ -MW 72.06), acrylonitrile (C_3H_3N -MW 53.06), methyl acrylate ($C_4H_6O_2$ -MW 86.09), ethyl 3-HP ($C_5H_{10}O_3$ -MW 118.13) และ acrylamide (C_3H_5NO -MW 71.08) (Raj และคณะ, 2008) ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในปริมาณมากสำหรับการผลิตสารยึดติด บรรจุภัณฑ์พลาสติก พอลิเมอร์เครื่องสำอางค์ น้ำยาทำความสะอาด และเรซิน ด้วยเหตุนี้ 3-HP จึงถูกเลือกให้เป็นสารเคมีมูลค่าเพิ่มจากชีวมวลที่มีความสำคัญ โดยกระทรวงพลังงานของสหรัฐอเมริกาได้มีการคาดการณ์ว่าจะมีการซื้อขายกันในตลาดทั่วโลกที่ประมาณ 2,420 ล้านกิโลต่อปี (Werpy และ Petersen, 2004)



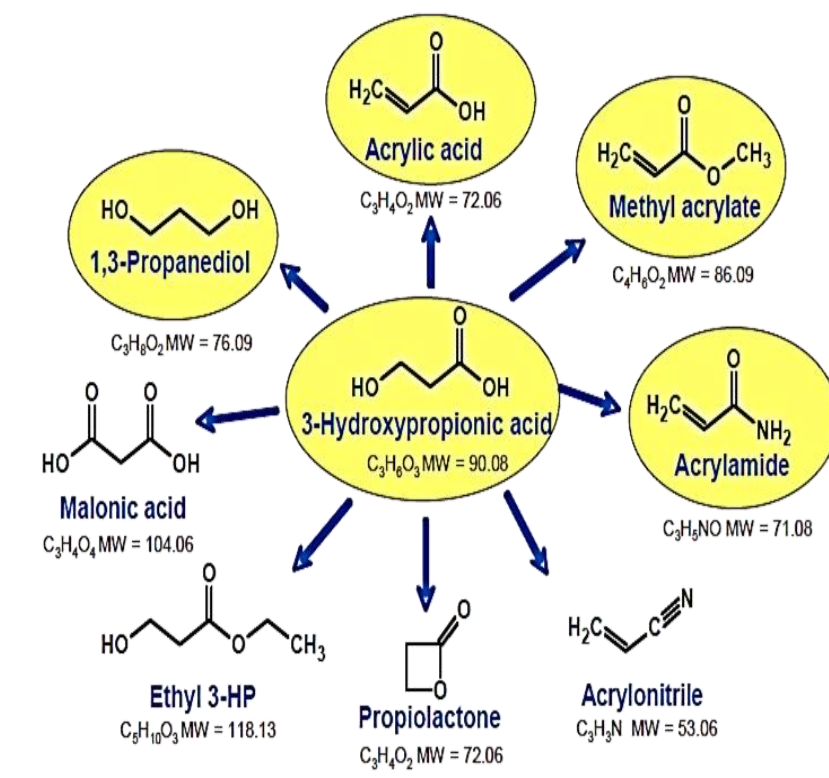
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxypropionic acid

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/File:3-Hydroxypropanoic_acid.png

วันที่สืบค้น 15 กันยายน 2558

2.1.2 ความสำคัญของ 3-hydroxypropionic acid

3-hydroxypropionic acid เป็นสารที่น่าสนใจในเชิงการค้าและจัดเป็นสารที่มีความสำคัญลำดับต้นๆ ของ Building Blocks จากทั้งหมด 12 ชนิด เนื่องจาก 3-hydroxypropionic acid ประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลและไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งเบตาจึงเหมาะที่จะใช้ในการสังเคราะห์เคมีภัณฑ์ที่มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้งาน อาทิเช่น acrylic acid, 1,3-propanediol (PDO), methyl acrylate, acrylamide, ethyl 3 -hydroxypropionic acid, malonic acid, propiolactone และ acrylonitrile เป็นต้น (ภาพที่ 2.2) สารอนุพันธ์ของ 3-hydroxypropionic acid เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สารเคลือบ สารหล่อลื่น สารป้องกันการเกิดไฟฟ้าสถิตในสิ่งทอ วัสดุตกแต่ง ศัลยกรรม และสารประกอบในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางค์ เป็นต้น (ตารางที่ 2.1) (Kumar และคณะ, 2013; Pina และคณะ, 2011; Zhang และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามในการผลิต 3-hydroxypropionic acid สามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ โดยสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ทั้งทางเคมีและทางชีวภาพมีหลายชนิด ได้แก่ glycerol, 3-hydroxypropanaldehyde (3-HPA), malonic acid, acrylic acid, 1,3-propanediol (PDO), lactic acid, malonic semialdehyde, acrylamide, allyl alcohol, 3 -hydropropionitrile และ β -propiolactone (ภาพที่ 2.3)



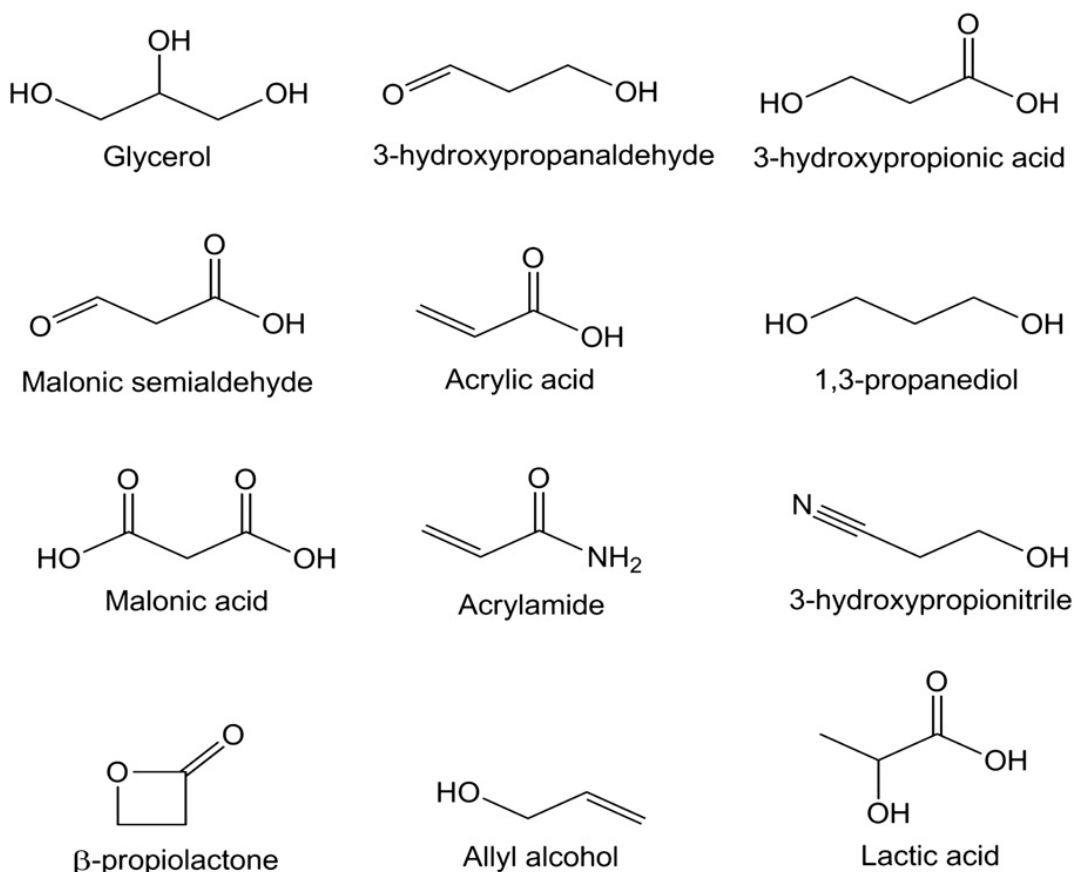
ภาพที่ 2.2 สารอนุพันธ์ที่ผลิตโดยใช้ 3-hydroxypropionic acid เป็นสารตั้งต้น

ที่มา : Werpy และ Petersen, 2004

ตารางที่ 2.1 สารอนุพันธ์ของ 3-hydroxypropionic acid

สารอนุพันธ์	กระบวนการเกิด	การนำไปใช้ประโยชน์
กรดอะคริลิก	ดีไฮเดรชัน	อุตสาหกรรมสิ่งทอ สี กระจก กาว โพลีเมอร์
1,3-โพรเพนไดออล	รีดักชัน	ตัวทำละลาย กาว เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เส้นใยและสิ่งทอ
3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนอลดีไฮด์	รีดักชัน	อาหาร ผลิตภัณฑ์เติมแต่งอาหารสัตว์ สารกันบูดในอุตสาหกรรมอาหาร

ที่มา : Jiang และคณะ, 2009



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxypropionic acid และสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต

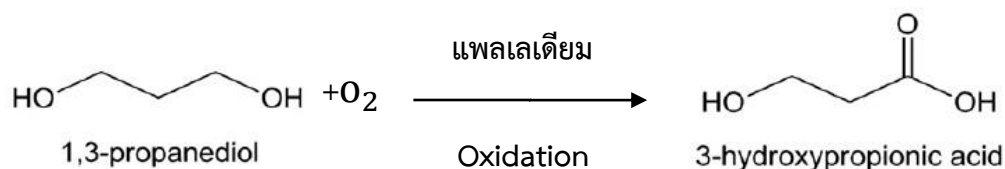
3-hydroxypropionic acid ทั้งทางเคมีและทางชีวภาพ

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

2.2 กระบวนการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธีทางเคมี

2.2.1 กระบวนการออกซิเดชัน 1,3-propanediol ผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาแพลเลเดียม

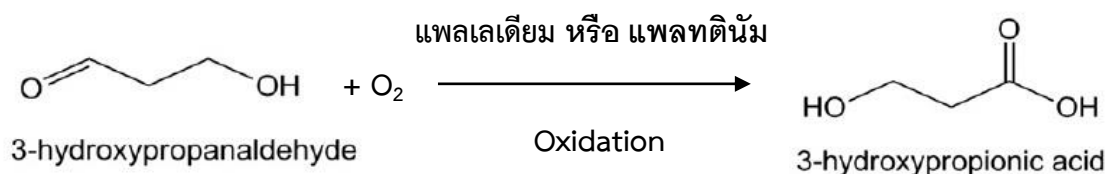
โดยการทำปฏิกิริยาของ 1, 3-propanediol กับแก๊สออกซิเจนในสารละลายต่างโดยมีแพลเลเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาปริมาณ 0.1-3.0 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณ 1, 3-propanediol ที่อุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส สามารถสร้างผลผลิต 3-hydroxypropionic acid ในอัตราที่ดี (Behr และคณะ, 1996) สำหรับกระบวนการออกซิเดชันของ 1, 3-propanediol โดยใช้แพลเลเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 กระบวนการออกซิเดชัน 1, 3-propanediol ที่มีแพลเลเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิต 3-hydroxypropionic acid

2.2.2 กระบวนการออกซิเดชัน 3-hydroxypropionaldehyde ผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาแพลเลเดียม

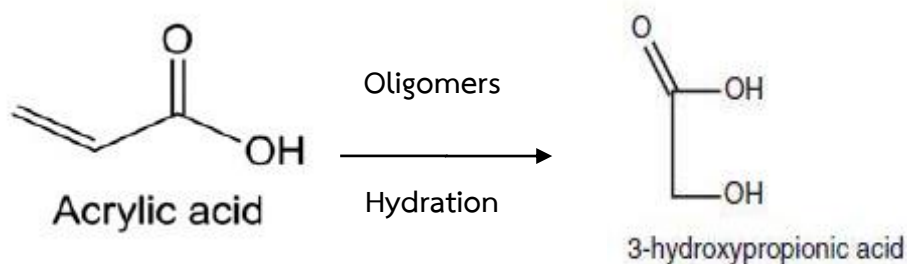
โดยการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 3-hydroxypropionaldehyde กับแก๊สออกซิเจนในตัวเร่งแพลเลเดียมหรือแพลทตินัมปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) (Haas และคณะ, 2000) สำหรับกระบวนการออกซิเดชัน 3-hydroxypropionaldehyde โดยใช้แพลเลเดียมหรือแพลทตินัมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 กระบวนการออกซิเดชันของ 3-hydroxypropionaldehyde ที่มีแพลเลเดียมหรือแพลทตินัมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิต 3-hydroxypropionic acid

2.2.3 กระบวนการไฮเดรชัน acrylic acid โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

วิธีนี้ถูกนำมาใช้ในการแก้ปัญหาเรื่องของตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งกรดและด่าง แต่การใช้กรดจะเป็นที่นิยมมากกว่า เนื่องจากสารตั้งต้นเป็น Oligomers ซึ่งมีขนาดเล็ก หลังจากกระบวนการ dehydration จะมีกรดอะคริลิกหลงเหลือ ต้องทำการแยกผลิตภัณฑ์โดยวิธีการต่างๆ เช่น การกลั่น การแยกลำดับส่วน การตกผลึก เป็นต้น (Meng และคณะ, 2007) สำหรับปฏิกิริยาไฮเดรชันของกรดอะคริลิกโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 กระบวนการไฮเดรชัน acrylic acid โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ถึงแม้ว่าจะมีกระบวนการทางเคมีในการผลิต 3-hydroxypropionic acid แต่กลับไม่มีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ในปัจจุบัน เนื่องจากต้นทุนที่สูงของวัตถุดิบและกระบวนการผลิต รวมถึงปัญหาสิ่งแวดล้อม (Jiang และคณะ, 2009) เนื่องจากแหล่งทรัพยากรในการผลิตสารเคมีเหล่านี้โดยส่วนใหญ่ นั้นมาจากปิโตรเลียมซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้แล้วหมดไป รวมถึงราคาที่ไม่แน่นอนของปิโตรเลียม ด้วยเหตุนี้ทำให้การสังเคราะห์ 3-hydroxypropionic acid จากชีวมวลกำลังได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเป็นอย่างมาก และเป็นทางเลือกที่สำคัญของภาคอุตสาหกรรม

2.3 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธีทางชีวภาพ

มีความต้องการผลิต 3-hydroxypropionic acid ในเชิงพาณิชย์ ในต้นทุนการผลิตที่ต่ำ และมีกระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ในปัจจุบันยังไม่พบจุลินทรีย์ธรรมชาติที่สามารถให้ผลลัพธ์ดังกล่าวไปในข้างต้น ดังนั้นจึงมีการสร้างจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม และพัฒนากระบวนการผลิตทางชีวภาพ เพื่อให้ได้กระบวนการผลิตทางชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ในการผลิต 3-hydroxypropionic acid เชิงพาณิชย์ ซึ่งการใช้การผลิตทางชีวภาพ เมื่อเทียบกับการผลิตด้วยวิธีทางเคมีมีข้อดีดังนี้

1. ลดการพึ่งพาปิโตรเลียมซึ่งมีราคาที่สูง
2. ลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สู่ชั้นบรรยากาศ
3. ลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม
4. สภาพที่ใช้ในการผลิตไม่รุนแรง

การศึกษาการผลิตทางชีวภาพของ 3-hydroxypropionic acid เริ่มต้นตั้งแต่ ค.ศ. 2000 ได้มีการสร้างจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* โดยสามารถใช้กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ได้มีการศึกษากระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต 3-hydroxypropionic acid นอกเหนือจากการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้างจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพและยังมีการพัฒนากระบวนการหมักที่สามารถใช้จริงได้ในปัจจุบัน

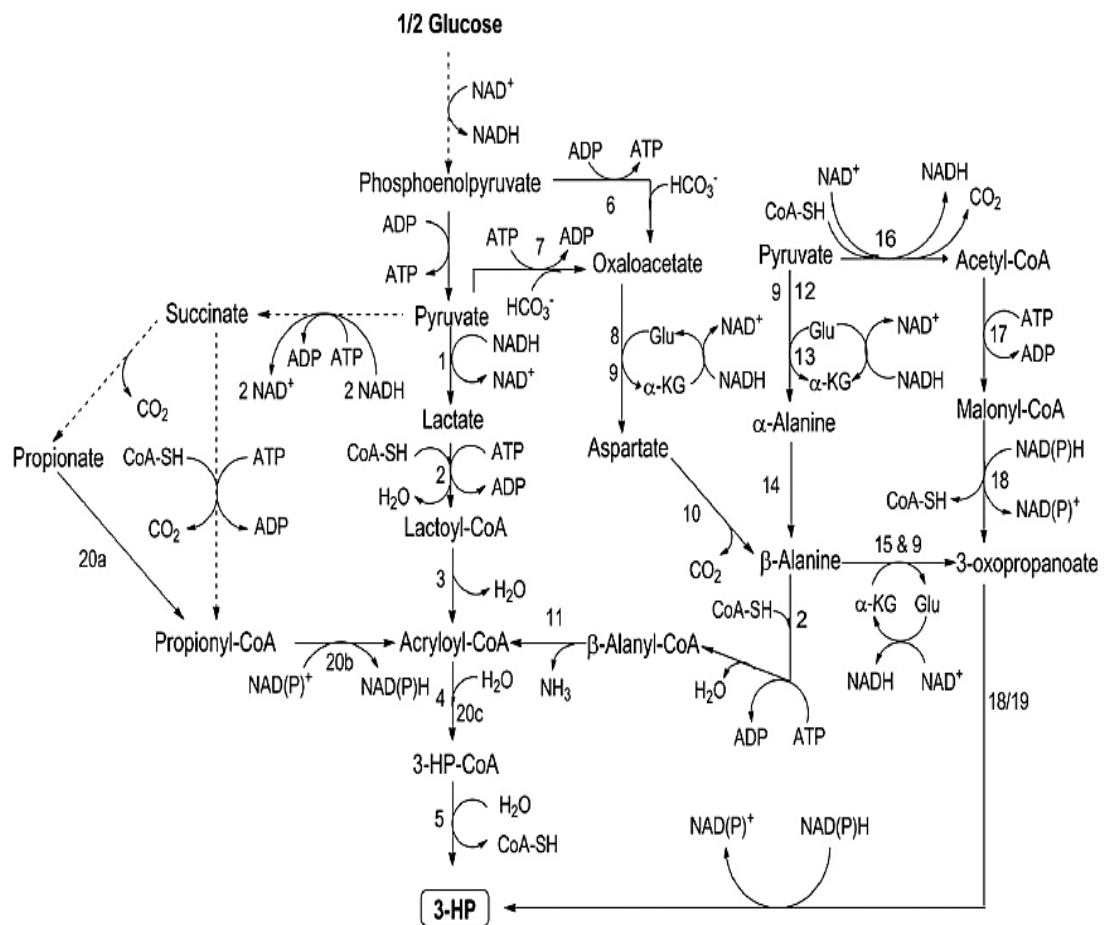
2.3.1 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส

บริษัท Cargill ได้มีการศึกษาและจดสิทธิบัตรเกี่ยวกับ biochemical pathways ทั้งหมด 7 pathways ที่สำคัญในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส โดยรายละเอียดของแต่ละ pathways แสดงไว้ดังตารางที่ 2.2 และภาพรวมของทั้ง 7 pathways แสดงดังภาพที่ 2.7

ตารางที่ 2.2 แสดงผลผลิต ATP และความเป็นไปได้ของการเกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานเทอร์โมไดนามิกของการใช้กลูโคสในการสร้าง 3-hydroxypropionic acid

Metabolic pathway	Net ATP yield ^a (mol/mol 3-HP)	Thermodynamic feasibility
I (Pyruvate → lactate → lactoyl-CoA → acryloyl-CoA → 3-HP-CoA → 3-HP)	1/0	Unfavorable
II (Pyruvate → acetyl-CoA → malonyl-CoA → 3-oxopropanoate → 3-HP)	0	Favorable
III (Pyruvate/PEP → OAA → aspartate → β-alanine → 3-oxopropanoate → 3-HP)	1/0	Favorable
IV (Pyruvate/PEP → OAA → aspartate → β-alanine → β-alanyl-CoA → acryloyl-CoA → 3-HP-CoA → 3-HP)	0/-1	Unfavorable
V (Pyruvate/PEP → succinate → propionate/propionyl-CoA → acryloyl-CoA → 3-HP-CoA → 3-HP)	-1/-0.33	Unfavorable
VI (Pyruvate → α-alanine → β-alanine → 3-oxopropanoate → 3-HP)	1	Favorable
VII (Pyruvate → α-alanine → β-alanine → β-alanyl-CoA → acryloyl-CoA → 3-HP-CoA → 3-HP)	1/0	Unfavorable

^aVaries depending on the route, intermediate (s) and enzyme (s) employed.



ภาพที่ 2.7 วิธีเมตาบอลิซึมในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. lactate dehydrogenase, 2. acetate-CoA ligase/CoA-transferase, 3. lactyl-CoA dehydratase, 4. 3-HP-CoA dehydratase, 5. 3-HP-CoA hydrolase/CoA-transferase/3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, 6. pyruvate carboxylase/carboxykinase, 7. pyruvate carboxylase, 8. aspartate aminotransferase, 9. glutamate dehydrogenase, 10. aspartate decarboxylase, 11. β -alanine-CoA ammonium lyase, 12. pyruvate-glutamate transaminase, 13. alanine dehydrogenase, 14. alanine 2,3-aminomutase, 15. 4-aminobutyrate aminotransferase/ β -alanine-2-oxoglutarate aminotransferase, 16. pyruvate dehydrogenase complex, 17. acetyl-CoA carboxylase, 18. malonyl-CoA reductase, 19. 3-hydroxyisobutyrate

dehydrogenase, 20. เอนไซม์ OS17 ซึ่งประกอบด้วย 3 โดเมน ได้แก่ a-CoA-synthetase, b-dehydrogenase และ c-3-HP dehydratase (Glu: glutamate; α -KG: α -ketoglutarate).

จากตารางที่ 2.2 และภาพที่ 2.7 จะเห็นว่า Pyruvate และ/หรือ phosphoenolpyruvate (PEP) เป็นสารตัวกลางที่มีความสำคัญในวิถีการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคส เมื่อกลูโคสถูกออกซิไดซ์จะได้เป็น pyruvate 2 โมล NADH 2 โมล พร้อมทั้งเกิดการสร้าง ATP อีก 2 โมล แต่อย่างไรก็ตามผลผลิต ATP สุทธิที่ได้อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในแต่ละวิถี ตัวอย่างเช่น

Pathway I

pyruvate $\rightarrow$ lactate $\rightarrow$ lactoyl-CoA $\rightarrow$ acryloyl-CoA $\rightarrow$ 3-HP-CoA $\rightarrow$ 3-hydroxypropionic acid

ในวิธีนี้จะมีการผลิต ATP 1 โมล ต่อ 3-hydroxypropionic acid 1 โมล ถ้าปฏิกิริยาการเปลี่ยน lactate ไปเป็น lactoyl-CoA เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ CoA-transferase

Pathway II

pyruvate $\rightarrow$ acetyl-CoA $\rightarrow$ malonyl-CoA $\rightarrow$ 3-oxopropanoate $\rightarrow$ 3-hydroxypropionic acid

ในการผลิต acetyl-CoA 1 โมล จากกลูโคส จะได้ NADH 2 โมล ATP 1 โมล และ CO₂ 1 โมล ซึ่งในทางตรงข้ามกับการเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน (carboxylation) ในการเปลี่ยน acetyl-CoA ไปเป็น malonyl-CoA จะมีการใช้ CO₂ 1 โมล และ ATP 1 โมล และจะมีการนำ NADPH 2 โมล ไปใช้ในปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) เพื่อเปลี่ยน malonyl-CoA ไปเป็น 3-hydroxypropionic acid ต่อไป (Rathnasingh และคณะ, 2012) ดังนั้นใน Pathway II นี้จึงไม่มี ATP สุทธิเหลืออยู่ และเอนไซม์ malonyl-CoA reductase ก็ไม่สามารถทำงานได้ เนื่องจากขาด NADH เป็นโคแฟกเตอร์

Pathway III

pyruvate/PEP $\rightarrow$ OAA $\rightarrow$ aspartate $\rightarrow$ β -alanine $\rightarrow$ 3-oxopropanoate $\rightarrow$ 3-hydroxypropionic acid

Pathway IV

pyruvate/PEP $\rightarrow$ OAA $\rightarrow$ aspartate $\rightarrow$ β -alanine $\rightarrow$ β -alanyl-CoA $\rightarrow$ acryloyl-CoA $\rightarrow$ 3-HP-CoA $\rightarrow$ 3-hydroxypropionic acid

โดยใน pathways III และ IV นั้นมี 3 ขั้นตอนที่เหมือนกัน คือ pyruvate/PEP $\rightarrow$ OAA $\rightarrow$ aspartate $\rightarrow$ β -alanine โดยในการเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันเพื่อเปลี่ยน PEP ไปเป็น oxaloacetate นั้นจะได้ ATP 1 โมล ถ้าอาศัยการทำงานของเอนไซม์ PEP carboxykinase แต่ในทางกลับกันจะไม่เกิดการสร้าง ATP เลยเมื่อถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ PEP carboxylase นอกจากนี้จะเกิดการผลิต NADH 1 โมล เมื่อกลูโคส 0.5 โมล เปลี่ยนเป็น oxaloacetate. 1 โมล ดังนั้นผลผลิต ATP ขึ้นอยู่กับสารตัวกลาง (pyruvate/PEP) และ/หรือเอนไซม์ที่ถูกใช้ในการเร่งปฏิกิริยา (PEP carboxylase/carboxykinase) นั้นเอง

Pathway V

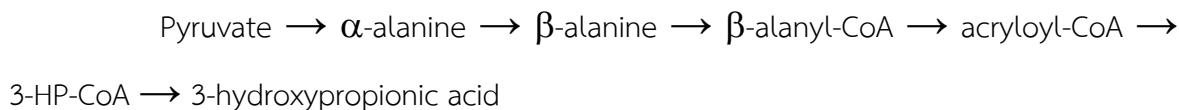
pyruvate/PEP $\rightarrow$ succinate $\rightarrow$ propionate/propionyl-CoA $\rightarrow$ acryloyl-CoA $\rightarrow$ 3-HP-CoA $\rightarrow$ 3-hydroxypropionic acid

วิธีนี้จะขึ้นอยู่กับวิธีการหมัก succinic acid และมี propionate เป็นสารตัวกลาง โดย Pyruvate หรือ PEP จะถูกเปลี่ยนไปเป็น succinate ซึ่ง succinate จะเปลี่ยนต่อไปเป็น propionyl-CoA โดยตรง หรืออาจเปลี่ยนไปเป็น propionate ก่อน จากนั้น propionyl-CoA จะเกิดปฏิกิริยา dehydrogenation โดยมีการกำจัด H ออกไป 2 โมเลกุล ได้เป็น acryloyl-CoA ซึ่งจะถูกไฮเดรตต่อไปเป็น 3-hydroxy propionyl-CoA (3-HP-CoA) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้เป็น 3-hydroxypropionic acid ในที่สุด โดยวิธีนี้จะให้ผลผลิต ATP สุทธิ เท่ากับ -1 แต่ถ้า propionyl-CoA เกิดขึ้นโดยเปลี่ยนของ propionate แล้วผลผลิต ATP สุทธิ จะเท่ากับ -0.33

Pathway VI

pyruvate $\rightarrow$ α -alanine $\rightarrow$ β -alanine $\rightarrow$ 3-oxopropanoate $\rightarrow$ 3-hydroxypropionic acid

Pathway VII



โดยใน pathways VI และ VII ถูกปรับปรุงขึ้นมาเนื่องจากขาดการสร้าง ATP ของ Pathways II, IV และ V โดยผลผลิต ATP สุทธิต่อ 3-hydroxypropionic acid 1 โมล ใน pathway VI เท่ากับ +1 แต่ในกรณี pathways VII อาจจะเท่ากับ 1 หรือ 0 ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยน β -alanine ไปเป็น β -alanyl-CoA ใช้เอนไซม์ใดในการดำเนินการ

จาก biochemical pathways ที่ถูกคิดค้นขึ้นทั้ง 7 วิธีนี้ พบว่ามี 4 วิธีที่ไม่สามารถเกิดขึ้นเองได้ทางเทอร์โมไดนามิกส์ (thermodynamically unfavorable) ได้แก่ pathway I, IV, V และ VII ส่วน 3 วิธีที่เหลือคือ pathway I, II และ VI นั้นสามารถเกิดขึ้นเองได้ทางเทอร์โมไดนามิกส์ และถ้าดูจากวิธีที่สามารถผลิต ATP ได้นั้น pathway VI มีความเป็นไปได้ในการเกิดสูงที่สุด ถึงแม้ว่าใน pathway VI จะมีปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของ β -alanine ไปเป็น 3-oxopropanoate ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่สามารถเกิดขึ้นเองได้ทางเทอร์โมไดนามิกส์ หากไม่ได้รับพลังงาน (ATP) แต่ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูง และผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นต่ำ (Mavrovouniotis, 1996) pathway VI นี้ได้รับการตรวจสอบโดยบริษัท Cargill และได้มีการรายงานว่ามีการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคสโดยใช้ pathway VI ซึ่งสามารถให้ความเข้มข้นและปริมาณผลผลิตที่สูง (Henry และคณะ, 2010; Jiang และคณะ, 2009) ยิ่งไปกว่านั้นในปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่าจุลินทรีย์ในธรรมชาติสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้จากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีเพียงจุลินทรีย์บางชนิดเช่น *E.coli* และยีสต์บางสายพันธุ์ที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมเท่านั้นที่สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลูโคสได้

2.3.2 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอล

กลีเซอรอล (glycerol) อาจเรียกว่า กลีเซอริน (glycerine หรือ glycerin) สูตรเคมีคือ $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโพลีออล (polyol) ลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีรสหวานเล็กน้อย (ความหวานสัมพัทธ์ 60) มีจุดเดือดที่ 290 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่ 17.8 องศาเซลเซียส โมเลกุลมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ จึงทำให้ละลายน้ำได้ดี มีสมบัติในการจับกับน้ำได้ดี (hygroscopic) กลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบหลักในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งได้

จากการรวมตัวของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน (fatty acid) 3 โมเลกุล ได้จากไฮโดรไลซ์น้ำมันจากพืชหรือไขมันจากสัตว์ โดยมีกรดหรือเบสเจือจางเป็นตัวเร่งพร้อมทั้งได้กรดไขมัน ในปฏิกิริยานี้ถ้าใช้เบสแก่เข้าทำปฏิกิริยาเพิ่มจะได้เกลือของกรดไขมันเรียกว่าสบู่ เรียกปฏิกิริยานี้ว่าสaponification) ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ โดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืชและไขมันสัตว์เป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งเป็นสารประกอบทางเคมี ที่ประกอบด้วยกรดไขมันและกลีเซอรอล เมื่อไตรกลีเซอไรด์รวมตัวกับสารเร่งปฏิกิริยาชนิดที่เป็นด่าง เช่นโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ โดยปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกินพอจะทำให้เกิดการรวมพันธะของกรดไขมันและแอลกอฮอล์ เกิดเป็นไบโอดีเซล (Biodiesel) และกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ จากปฏิกิริยาที่เรียกว่า transesterification โดยที่ R คือ คาร์บอน 16-18 อะตอม ซึ่งมีพันธะคู่ระหว่าง C = C ตั้งแต่ 1-3 คู่

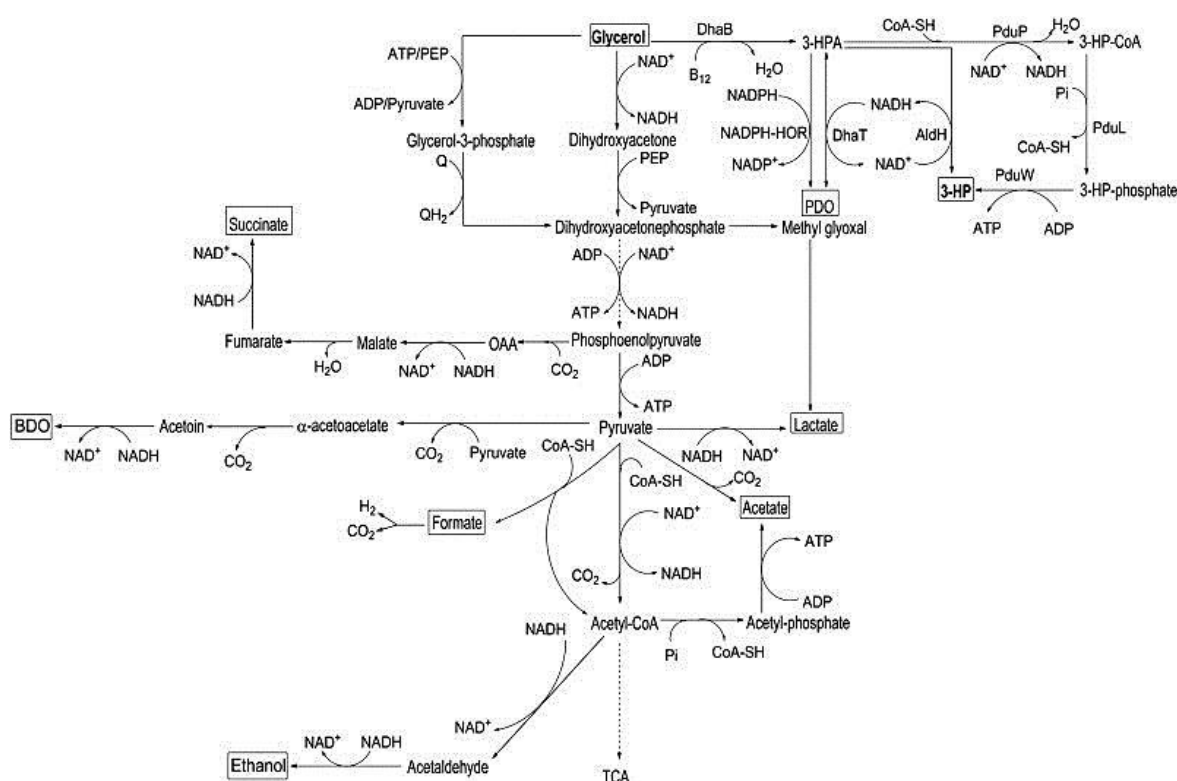
ในกระบวนการทางชีวภาพของกลีเซอรอลนั้น มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่สามารถใช้กลีเซอรอลทั้งในการย่อยแบบใช้ออกซิเจนและแบบไม่ใช้ออกซิเจน ดังนั้นจึงมีการนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นสารตั้งต้น (แหล่งคาร์บอน) เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่า โดยแบคทีเรียที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เช่น *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula* และ *Enterobacter aerogenes* โดยที่ภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจนจะสามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นก๊าซไฮโดรเจน และเอทานอล (Joshson และ Taconi, 2007) นอกจากนี้ การหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนยังสามารถผลิต 1,3-propanediol (PDO) และผลิตภัณฑ์ร่วมเช่น acetic acid, butyric acid, butanol, acetone, lactic acid, succinic acid, formate และ 2,3-Butanediol เป็นต้น

ดังนั้นกลีเซอรอลจึงเป็นสารเคมีที่มีปริมาณมากและสามารถถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารเคมีมูลค่าสูง โดยอาศัยการหมักของจุลินทรีย์ เช่น 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, ethanol, succinic acid และ 3-hydroxypropionic acid เป็นต้น กระบวนการหมักกลีเซอรอลสามารถผลิตได้ผลตอบแทนที่สูงกว่ากระบวนการหมักของน้ำตาลทั่วไป การเปลี่ยนแปลงของกลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$; $k = 4.67$) ไปเป็น phosphoenolpyruvate (PEP) หรือ pyruvate โดยสารทั้งสองจะถูกผลิตขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$; $k=4$) หรือไซโลส ($C_5H_{10}O_5$; $k=4$) นอกจากนี้กลีเซอรอลที่ผลิตโดยการหมักของจุลินทรีย์และที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตสบู่และไบโอดีเซลซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมาก จึงทำให้มีราคาถูกกว่ามากเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส และข้อได้เปรียบเหล่านี้เองจึงทำให้กลีเซอรอลได้กลายเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตสารเคมีต่างๆ ผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ สำหรับคุณสมบัติต่าง ๆ ของกลีเซอรอลนั้นแสดงไว้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงคุณสมบัติของกลีเซอรอล

สูตรโมเลกุล	$C_3H_8O_3$
ความหนาแน่น	1.26 g/cm ³
จุดหลอมเหลว	17.8 °C
จุดเดือด	290 °C
มวลโมเลกุล	92.09382 g/mol
IUPAC ID	propane-1,2,3-triol
การละลาย	ละลายได้ในน้ำ

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน จุลินทรีย์ที่เจริญส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย ได้แก่ *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* และ *Lactobacillus* สามารถใช้กลีเซอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถผลิต propanediol (PDO) เป็นผลิตภัณฑ์ร่วม และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *K. pneumonia*, *L. reuteri* และ *L. collinoides* สามารถสร้าง 3-hydroxypropionic acid ได้โดยการออกซิไดซ์ 3-HPA พร้อมกับการสร้าง PDO (Garai-Ibabe และคณะ, 2008; Krauter และคณะ, 2012; Sobolov และคณะ, 1960; Talarico และคณะ, 1988) โดยการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอลประกอบไปด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ผ่าน 2 pathway ได้แก่ CoA-dependent pathway และ CoA-independent pathway แสดงดังภาพที่ 2.8



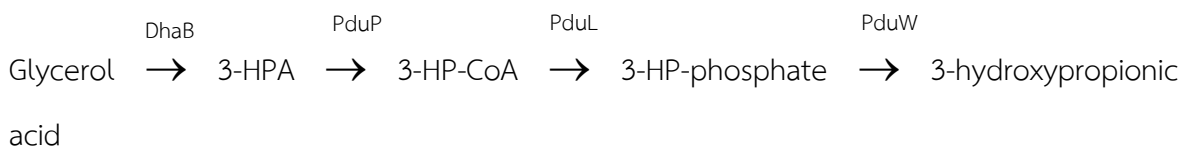
ภาพที่ 2.8 แสดง Metabolic pathways ในกระบวนการเมแทบอลิซึมกลีเซอรอล ผ่าน 2 pathway ได้แก่ CoA-dependent pathway และ CoA-independent pathway

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

2.3.2.1 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอลโดยวิถี CoA-dependent pathway

วิถี CoA-dependent pathway เกิดขึ้นจากการ degradation สาร 1,2-propanediol (1,2-PDO) ซึ่งสามารถพบได้ใน *Salmonella enterica* (Leal และคณะ, 2003) ซึ่ง 1,2-PDO จะถูกเปลี่ยนไปเป็น propionaldehyde ด้วยเอนไซม์ B12-dependent diol dehydratase (DhaB) จากนั้น propionaldehyde จะเกิด disproportionation ได้ผลิตภัณฑ์เป็น propanol และ propionic acid โดยอาศัยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน เช่น propanol dehydrogenase, coenzyme A (CoA)-dependent propionaldehyde dehydrogenase (PduP), phosphotransacylase (PduL) และ propionate kinase (PduW) และจะได้ ATP เป็นผลิตภัณฑ์ในช่วงของการเกิด dephosphorylation ของการเปลี่ยน propionyl phosphate ไปเป็น propionate (ภาพที่ 2.8) โดยกลุ่มยีนทั้งหมดที่จำเป็นสำหรับการเมแทบอลิซึม 1,2-PDO ของ *S. enterica* อยู่บนตำแหน่งที่เรียกว่า propanediol utilization (*pdu*) (Leal และคณะ, 2003; Liu และคณะ, 2007; Xue และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังพบวิธีการผลิต

เช่นนี้ได้ใน *K. pneumonia*, *L. reuteri* และ *L. collinoides* อีกด้วย (Luo และคณะ, 2012) ในกรณีของวิถี CoA-dependent pathway นี้ลำดับปฏิกิริยาต่าง ๆ เป็นดังนี้



จากการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* sp. (*L.* strain 208-A, *L. reuteri* และ *L. collinoides*), *S. enteric* และ *K. pneumoniae* มีการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิถี CoA-dependent pathway

Yasuda และคณะ (2007) รายงานว่า resting cells ของ *L. reuteri* สายพันธุ์กลายที่ไม่เอนไซม์ glycerol dehydrogenase สามารถผลิต PDO 7.2 กรัม/ลิตร และ 3-hydroxypropionic acid 8.5 กรัม/ลิตร

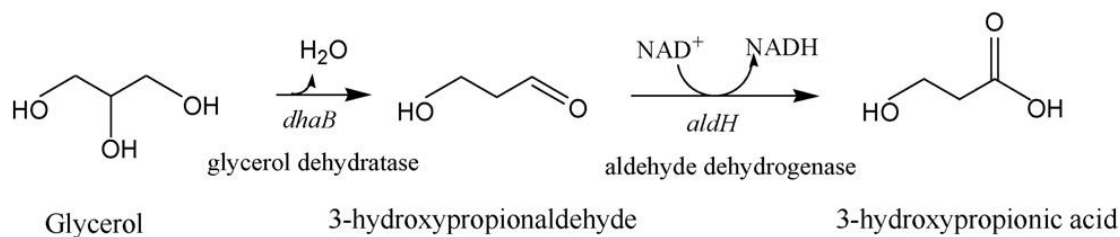
Luo และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาคูสมบัติของเอนไซม์ propionaldehyde dehydrogenase (PduP) จาก *L. reuteri* พบว่าเอนไซม์ PduP มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นในกลุ่ม aliphatic aldehydes รวมถึง 3-HPA และสามารถใช้น้ำ NAD⁺ และ NADP⁺ เป็นโคแฟกเตอร์ ในการทดสอบสารตั้งต้นพบว่ามีความจำเพาะสูงที่สุดกับ propionaldehyde โดยมีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 1.18 มิลลิโมลาร์ และ 0.35 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ ที่ 37 องศาเซลเซียส pH 7.8 นอกจากนี้ยังพบว่า *K. pneumoniae* มีความสามารถในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอล โดยใช้กลุ่มเอนไซม์ใน pdu operon (Luo และคณะ, 2012) โดยสายพันธุ์กลายสามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid ได้ในระดับเดียวกับสายพันธุ์ปกติ (wild type) แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมเมแทบอลิก (metabolic activity) ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้การเกิดการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น (overexpression) ของยีน pduP มีส่วนในการเพิ่มการผลิต 3-hydroxypropionic acid ยืนยันได้จากที่เอนไซม์ PduP มีส่วนร่วมในการผลิต 3-hydroxypropionic acid ใน *K. pneumoniae*

Luo และคณะ (2012) พบว่า *K. pneumoniae* สายพันธุ์กลายที่ไม่มียีน pduP และ *K. pneumoniae* สายพันธุ์ปกติ มีระดับการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันจนถึงชั่วโมงที่ 15 แต่หลังจากชั่วโมงที่ 15 มีการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในสายพันธุ์กลายอย่างเห็นได้ชัด โดยสายพันธุ์กลายมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid ประมาณ 1.0 กรัม/ลิตร ในเวลา 15 ชั่วโมง และไม่มีการผลิตต่อ ในขณะที่สาย

พันธุ์ปกติมีการผลิต 3-hydroxypropionic acid อย่างต่อเนื่องประมาณ 2.0 กรัม/ลิตร ในเวลา 25 ชั่วโมง ในกรณีของสายพันธุ์กลายที่มีปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ต่ำ และเกิดการตายของเซลล์ น่าจะเป็นผลมาจากการสะสมความเป็นพิษจาก intermediate metabolite 3-HPA (~6 mM) ซึ่งเมื่อเกิด overexpression ของยีน *pduP* ในสายพันธุ์กลาย พบว่าระดับของการเมตาบอลิซึมกลีเซอรอลอยู่ในระดับปกติ แต่ระดับของ 3-hydroxypropionic acid ลดลง และเซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง

2.3.2.2 การผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอลโดยวิถี CoA-independent pathway

สำหรับวิถี CoA-independent pathway นั้นขั้นตอนแรกจะเป็นการเปลี่ยน glycerol ไปเป็น 3-HPA โดยอาศัยเอนไซม์ B12-dependent diol dehydratase (DhaB) เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยานี้สามารถเกิดขึ้นได้โดยใช้เอนไซม์ Glycerol dehydratase (GDHt) ซึ่งเอนไซม์ GDHt ใน pathway นี้ไม่ต้องการวิตามิน B12 เป็น Coenzyme แต่อย่างไรก็ตาม GDHt ยังไม่มีการนำไปใช้ในการผลิต 3-hydroxypropionic acid เพราะค่อนข้างไวต่อออกซิเจน ดังนั้นการผลิต 3-hydroxypropionic acid จะต้องดำเนินการภายใต้สภาวะการจำกัดการให้ออกซิเจน ดังนั้นการผลิต 3-hydroxypropionic acid จะต้องดำเนินการภายใต้สภาวะการจำกัดการให้ออกซิเจน นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่จำเป็นต่อ pathway นี้อีกชนิดหนึ่งคือ aldehyde dehydrogenase (ALDH) ซึ่งทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 3-HPA ไปเป็น 3-hydroxypropionic acid การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ต้องการ NAD^+ เป็นโคแฟกเตอร์ และเอนไซม์ชนิดนี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียบางชนิด เช่น *K. pneumonia* และ *Lactobacillus* sp. สามารถพบเอนไซม์ ALDHs แต่กิจกรรมของการทำงานยังไม่สูงมากนัก ดังนั้นการแสดงออกของกิจกรรมเอนไซม์ ALDHs ที่สูงจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพในการผลิต 3-hydroxypropionic acid จากกลีเซอรอล โดยความแตกต่างจากวิถี CoA-dependent pathway กล่าวคือวิถี CoA-independent pathway จะไม่มีการผลิต ATP และไม่ต้องการ coenzyme A แต่ทั้ง 2 pathway มีความต้องการโคแฟกเตอร์ที่เหมือนกันคือ NAD^+ ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการ oxidative metabolism ของกลีเซอรอลและ/หรือในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนนั่นเอง สำหรับการสังเคราะห์ 3-hydroxypropionic acid โดยวิถี CoA-independent pathway นั้น แสดงดังภาพที่ 2.9



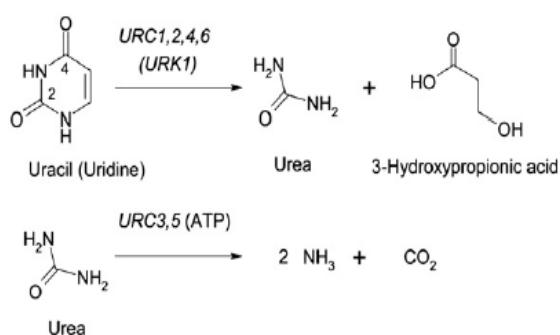
ภาพที่ 2.9 แสดงการผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธี CoA-independent pathway

ที่มา : Raj และคณะ, 2008

2.3.3 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยการย่อยสลาย acrylic acid และ uracil

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถเปลี่ยน acrylic acid ไปเป็น 3-hydroxypropionic acid ได้ (Takamizawa และคณะ, 1993) เช่น *Byssochlamys* sp. สามารถผลิต 3-hydroxypropionic acid (4.8 % v/v) จาก acrylic acid นอกจากนี้ยังพบว่ามี การสะสมของ 3-hydroxypropionic acid ชั่วคราวในระหว่างการย่อยสลาย acrylic acid โดยเชื้อรา *Geotrichum* sp. และ *Trichoderma* sp. ที่แยกได้จากกากตะกอนโรงบำบัดน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

นอกจากนี้ 3-hydroxypropionic acid สามารถเกิดได้จากการการย่อยสลาย uracil ซึ่งเป็น pyrimidine base โดย Andersen และคณะ (2008) พบว่าในระบบการย่อยสลาย uracil ซึ่งเป็นอิสระจากระบบทางเดินหายใจของ *Saccharomyces kluyveri* นั้น พบสารหลายชนิดได้แก่ uridinemonophosphate ยูเรีย แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ และ 3-hydroxypropionic acid เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการย่อยสลาย uracil และสันนิษฐานว่า 3-hydroxypropionic acid ถูกสร้างจาก malonicsemialdehyde โดยใช้เอนไซม์ reductase (ดังภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยอาศัยกระบวนการย่อยสลาย uracil

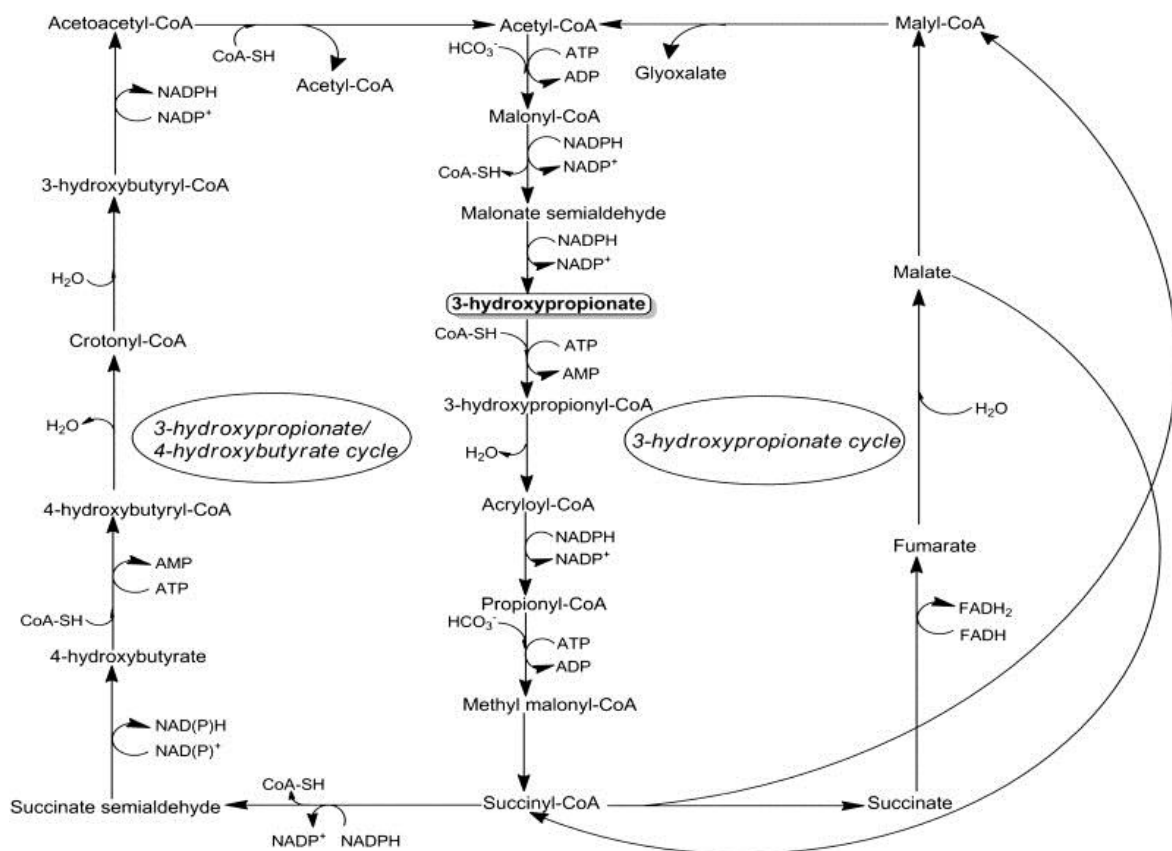
ที่มา : Andersen และคณะ, 2008

โดย (N1–C2–N3) ถูกปล่อยออกมาในรูปของยูเรีย และถูกย่อยสลายต่อไปเป็นแอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ ATP-dependent ureaamidolyase ส่วน (C4–C5–C6) ถูกปล่อยออกมาในรูปของ 3-hydroxypropionic acid

2.3.4 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวัฏจักร 3-hydroxypropionate และ 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate

3-hydroxypropionic acid เป็นสารตัวกลางในวัฏจักร 3-hydroxypropionate และ 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (ภาพที่ 2.11) ซึ่งเป็นวัฏจักรหนึ่งที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียจำพวก autotrophic บางชนิดที่สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (Fuchs, 2011; Saini และคณะ, 2011) เช่น *Chloroflexus aurantiacus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ทนความร้อน โดยแบคทีเรียดังกล่าวจะผลิต 3-hydroxypropionic acid ในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่ปริมาณของ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้มีจำนวนน้อยเพียง 1.5 ไมโครโมลาร์ แต่สามารถปรับปรุงให้มีการผลิตสูงขึ้นได้โดยการเติม acetate หรือ KCN ลงไปในอาหาร แต่ปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ผลิตได้จำนวนสูงที่สุดเท่ากับ 350 ไมโครโมลาร์ ซึ่งจะพบได้เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี propionate (Holo, 1989) นอกจากนี้ยังพบวัฏจักรดังกล่าวนี้ในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *Acidianus brierleyi*, *Metallosphaera sedula*, *Acidianus ambivalens*, *Sulfolobus* sp. strain VE6 และ *Sulfolobus metallicus* (Hügler และคณะ, 2003; Saini และคณะ, 2011) สำหรับวัฏจักร 3-Hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (ภาพที่ 2.11) ถูกพบครั้งแรกในแบคทีเรีย *Metallosphaera sedula* โดยวิถีเมตาบอลิซึมของทั้งสองวัฏจักรนี้อาศัยเอนไซม์ biotin-dependent acetyl-CoA carboxylase และเอนไซม์ propionyl-CoA carboxylase ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยวิถีเมตาบอลิซึมเริ่มต้นด้วยการเกิด carboxylation ของ acetyl-CoA ไปเป็น malonyl-CoA โดยอาศัยเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase และมีการใช้ ATP 1 โมเลกุล จากนั้น Malonyl-CoA จะเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxypropionic acid โดยผ่าน malonate semialdehyde ซึ่งเป็นสารตัวกลาง และมีการใช้ NADPH 2 โมเลกุล ซึ่ง 3-hydroxypropionic acid จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น propionyl-CoA และการเกิดกระบวนการ carboxylation ต่อไปจนได้ methylmalonyl-CoA และจะเกิดกระบวนการไฮโดรเมไธลของ methylmalonyl-CoA กลายเป็น succinyl CoA ในที่สุด และภายหลังจากนี้วัฏจักรทั้งสองก็จะมีวิถีเส้นทางที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าหาก 3-hydroxypropionic acid สามารถผลิตได้จากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นั้นจะกลายเป็นที่น่าสนใจยิ่ง

เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีอยู่ในอากาศและสามารถนำไปใช้ได้อย่างง่ายดาย นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกซึ่งถือเป็นปัจจัยที่สำคัญของต้นทุนการผลิตอีกด้วย (Jiang และคณะ, 2009)



ภาพที่ 2.11 การผลิต 3-hydroxypropionic acid โดยวิธี autotrophic ผ่านวัฏจักร 3-hydroxypropionate และ 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate

ที่มา : Kumar และคณะ, 2013

2.4 ความเป็นพิษของ 3-hydroxypropionic acid

โดยทั่วไปความเป็นพิษของกรดอินทรีย์จะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยกรดอินทรีย์ต่างๆเหล่านี้หากอยู่ภายในเซลล์จะไปทำลายสมดุลความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์และการแลกเปลี่ยนไอออนในไซโทพลาสซึม ความเป็นกรดที่เกิดขึ้นภายในไซโทพลาสซึมนี้จะส่งผลให้เบสเพียวรีนเกิดการบวกรวนการ denaturing ทำให้เอนไซม์ที่สำคัญไม่สามารถถูกสร้างขึ้นและสิ่งมีชีวิตนั้นก็จะไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ต่อไป สภาวะความเป็นกรดในไซโทพลาสซึมยังส่งผลกระทบต่อเซลล์อีกมากมาย ได้แก่ ความสามารถในการแลกเปลี่ยนสารอาหารและการสร้างพลังงานภายในเซลล์ การรักษา

สมดุลของความเป็นกรด-ด่างในไซโตพลาสซึม และการปกป้องโปรตีนและดีเอ็นเอภายในเซลล์ (Booth และคณะ, 2002; Roe และคณะ, 2002; Warnecke และ Gill, 2005)

การส่งกรดอินทรีย์ออกนอกเซลล์ต้องใช้พลังงานสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งออกของกรดในสถานะที่มีค่าพีเอชต่ำ โดย van Maris และคณะ (2004) พบว่าที่พีเอชต่ำจำเป็นต้องใช้พลังงานในการขนส่งผลิตภัณฑ์ออกนอกเซลล์เท่ากับหรือสูงกว่ากระบวนการเผาผลาญพลังงานเพื่อใช้สร้างผลิตภัณฑ์ 3-hydroxypropionic acid และแลคเตท (Van Maris และคณะ, 2004) ก่อให้เกิดผลกระทบต่อกระบวนการเผาผลาญพลังงานเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและใช้ในการทำงานที่สำคัญของเซลล์ ซึ่งจะเกิดความเสียหายอย่างร้ายแรงต่อระบบเผาผลาญของเซลล์และทำให้เซลล์นั้นไม่สามารถรักษาหรือซ่อมแซมตัวเองได้และจะต้องตายไปในที่สุด ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของกรดสามารถแก้ไขได้บางส่วนโดยการดัดแปลงจุลินทรีย์ให้มีลักษณะทนต่อสถานะพีเอชต่ำและสามารถหมักได้ในสถานะพีเอชต่ำกว่าค่า pKa ของกรด (Warnecke และ Gill, 2005) รวมถึงการใช้ต่างเป็นตัวเพิ่มพีเอชในระหว่างกระบวนการหมัก แต่อาจไปลดการเกิด 3-hydroxypropionic acid นอกจากนี้ความเป็นกรดยังเป็นสิ่งรบกวนการทำงานของไอออนที่จำเพาะเจาะจงกับกระบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์ โดยความเป็นพิษของ 3-hydroxypropionic acid จะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งวิถีของ chorismate และ threonine อย่างไรก็ตามมีการทดสอบความทนทานต่อความเป็นกรดของแบคทีเรียที่ผ่านการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเอนไซม์ในวิถี chorismate และ threonine ที่บริเวณแตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความทนต่อความเป็นกรดมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเติมสารเมตาบอไลต์ที่เกี่ยวข้องกับวิถี chorismate และ threonine ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Warnecke และคณะ, 2012)

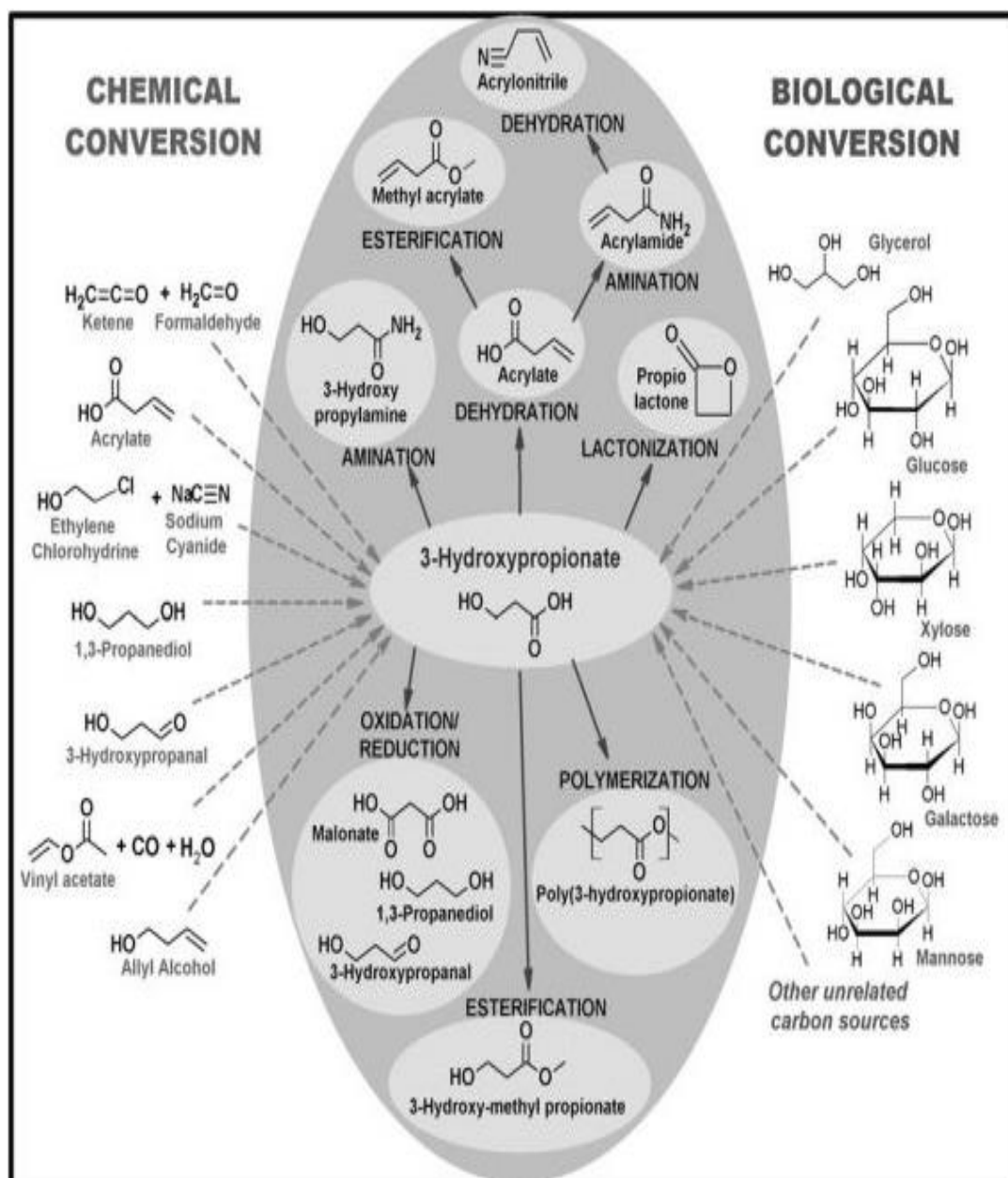
3-hydroxypropionic acid มีความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เช่นเดียวกับกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยในช่วงระยะการเจริญเติบโตช่วงปลายของเชื้อ *K. pneumonia* และ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการตัดต่อยีนส์ พบว่ามีอัตราการผลิต 3-hydroxypropionic acid สูงถึง 200-300 มิลลิโมลาร์ แต่การผลิตจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติม 3-hydroxypropionic acid ลงในอาหารอย่างต่อเนื่อง และพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์รวมถึงการใช้กลีเซอรอลและการผลิต 3-hydroxypropionic acid นั้นลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน (Kumar และคณะ, 2012; Ashok และคณะ, 2013; Rathnasingh และคณะ, 2009) นอกจากนี้ได้มีการทดสอบโดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และตรวจสอบความสัมพันธ์ของการเกิดผลิตภัณฑ์ 3-hydroxypropionic acid กับปริมาณ 3-hydroxypropionic acid ที่ถูกเติมลงไปจากภายนอก พบว่าเมื่อเติม 3-hydroxypropionic acid ที่ความเข้มข้น 0, 120, 270, 530 และ 790 ไมโครโมลาร์ มีการผลิต 3-

hydroxypropionic acid เท่ากับ 27.5, 17.7, 10.8, 6.2 และ 7.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า อัตราการผลิตลดลงอย่างเห็นได้ชัด

อย่างไรก็ตามจากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีและการวิเคราะห์จีโนมิกในปัจจุบันได้ถูกนำมาใช้ในเพื่อศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ศึกษาสารประกอบที่เป็นพิษ และศึกษากลยุทธ์ต่างๆที่สามารถยับยั้งสารพิษได้ (Dunlop, 2011; Jarboe และคณะ, 2011) โดยกลยุทธ์ที่ใช้ในการปรับปรุงความทนทานต่อสารพิษประกอบด้วย ระบบการขนส่งสารของเซลล์ การปรับเปลี่ยนเมมเบรน และการตอบสนองต่อแรงกดดัน เป็นต้น (Alper และคณะ, 2006)

2.5 การนำ 3-hydroxypropionic acid ไปประยุกต์ใช้งาน

3-hydroxypropionic acid จัดเป็นสาร building blocks อันดับที่สามารถทั้งหมด 12 อันดับ ซึ่งคัดเลือกโดย US Department of Energy (DOE) (Werpy and Petersen, 2004) สามารถสร้างได้จากการเปลี่ยนแปลงสารชีวมวล ใช้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่หลากหลาย สารประกอบอินทรีย์เหล่านี้ใช้เป็นตัวกลางในการผลิตสารเคมี เช่น acrylic acid, 1, 3-propanediol(PDO), methyl acrylate, acrylamide, ethyl 3-hydroxypropionic, malonic acid, propiolactone acrylonitrile (ภาพที่ 2.12) นอกจากนี้ 3-hydroxypropionic acid ยังใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์เคลือบโพลีเมอร์ ผลิตภัณฑ์หล่อลื่นและสารป้องกันไฟฟ้าสถิตสำหรับสิ่งทอ หรืออาจใช้เป็นวัสดุสำหรับปฏิกิริยา cyclization และปฏิกิริยา polymerization ในการผลิต propiolactone, polyesters และ oligomers โดยเฉพาะโพลีเมอร์ที่ผลิตได้จากการกลั่นตัวของ 3-hydroxypropionic acid ที่เรียกว่า poly 3-hydroxypropionic acid ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุสำหรับการผ่าตัดและยา ซึ่งถือว่าเป็นสิ่งใหม่ที่เริ่มเกิดขึ้นในวงการแพทย์ และ poly 3-hydroxypropionic acid ยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและเป็นพอลิเมอร์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้แทนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปิโตรเลียม



ภาพที่ 2.12 สารตั้งต้นทางเคมีและทางชีวภาพที่สามารถใช้ในการสังเคราะห์ 3-hydroxypropionic acid

และผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก 3-hydroxypropionic acid

ที่มา: Valdehuesa และคณะ, 2013