# บทที่ 2

# วารสารปริทัศน์

## พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA)

PHA เป็นพอลิเมอร์ประเภทเทอร์โมพอลิเอสเทอร์ (thermopolyester) ที่มีสมบัติคล้ายกับพอลิโพรพิลีน และพอลิเอทิลีน ซึ่งเป็นพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีที่ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ส่วนใหญ่ในปัจจุบัน สมบัติที่ใกล้เคียงกัน เช่น จุดหลอมเหลว, ความสามารถเป็นผลึก, การต้านแรงดึง, น้ำหนักโมเลกุล (Brandl และคณะ, 1990) นอกจากนั้น PHA มีความสม่ำเสมอทางด้านเคมีสเตอริโอของหน่วยซ้ำ ไม่ละลายน้ำ และสามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป รวมทั้งในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยแบคทีเรีย รา สาหร่าย และสเตรปโตมัยซีสที่เกาะบนผิวของพอลิเมอร์แล้วปล่อยเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์ดีพอลิเมอเรสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยพอลิเมอร์ให้เป็นหน่วยของโมโนเมอร์ จากนั้นโมโนเมอร์จะละลายน้ำแล้วถูกดูดซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ และเกิดปฏิกิริยาการเมตาบอไลซ์เปลี่ยนเป็นสารที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ ได้น้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในภาวะที่มีออกซิเจน หรือได้ก๊าซมีเทนภายใต้ภาวะไร้อากาศ (Lee, 1996(a); Cox, 1994)

## จุลินทรีย์ที่สร้างและสะสม PHA

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์บางชนิดสามารถสังเคราะห์และสะสม PHA ได้ ดังแสดงในตารางที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 1** จุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง และสะสม PHA (Brandl และคณะ, 1990; Doi, 1990; Hassan และคณะ, 1996; Suzuki และคณะ, 1996)

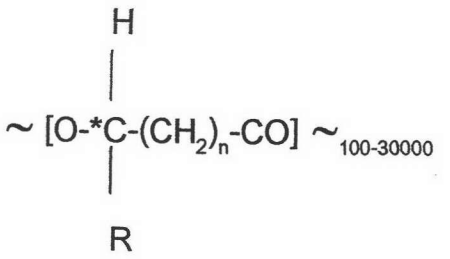
| | | |
|---|---|---|
| *Acidovorax* | *Gamphosphaeria* | *Photobacterium* |
| *Acinetobacter* | *Haemophilus* | *Pseudomonas* |
| *Actinobacillus* | *Halobacterium* | *Rhizobium* |
| *Actinomycetes* | *Hydrogenophaga* | *Rhodobacter* |
| *Alcaligenes* | *Hyphomicrobium* | *Rhodospirillum* |
| *Aphanothece* | *Lamprocystis* | *Sphaerotilus* |
| *Aquaspirillum* | *Lampropedia* | *Spirillum* |
| *Azotobacter* | *Leptotrix* | *Spirulina* |
| *Bacillus* | *Methylobacterium* | *Streptomyces* |
| *Beggiatoa* | *Methylocystis* | *Synechococcus* |
| *Beijerinckia* | *Methylosinus* | *Syntrophomonas* |
| *Burkladeria* | *Micrococcus* | *Thiobacillus* |
| *Caulobacter* | *Microcoleus* | *Thiocapsa* |
| *Chlorofrexeus* | *Mycrocystis* | *Thiocyctis* |
| *Chlorogloea* | *Moraxella* | *Thiodictyon* |
| *Chromatium* | *Mycoplana* | *Thiopedia* |
| *Chromobacterium* | *Nitrobacter* | *Thiosphaera* |
| *Clostridium* | *Nitrococcus* | *Vibrio* |
| *Derxia* | *Nocardia* | *Xanthobacter* |
| *Ectothiorhodospira* | *Oceanospirillum* | *Zoogloea* |
| *Escherichia* | *Paracoccus* | |
| *Ferrobacillus* | *Paucispirallum* | |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**โครงสร้างของ PHA**

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวแรกกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวถัดไปตรงตำแหน่งบีตาคาร์บอน ซึ่งเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) ที่แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration การต่อเชื่อมกันของแต่ละโมโนเมอร์เป็นแบบหัวต่อหางที่มีหมู่อัลคิล(R) ต่ออยู่ด้านเดียวกันของสายโซ่คาร์บอนอย่างสม่ำเสมอ จึงมีความสม่ำเสมอทางด้านเคมีสเตอริโอของหน่วยซ้ำ (isotactic) คล้ายกับพอลิโพรพิลีน (Byrom, 1987) แสดงในรูปที่ 1 นอกจากพอลิเอสเตอร์สายตรงแล้ว อาจมีโครงสร้างเป็นแบบพันธะคู่ แบบอะโรมาติก แบบฮาโลจิเนต หรือแบบแตกกิ่งก้าน (Madison และ Huisman, 1999) จากรายงานการวิจัยของ Quinteros และคณะ (1999) พบว่าความยาวของสายพอลิเมอร์ และโครงสร้างของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของสายพอลิเมอร์มีผลทำให้ PHA มีคุณสมบัติแตกต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| เมื่อ n = 1 | R = ไฮโดรเจน | (H) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต) | : P(3HP) |
| | R = เมทธิล | ($CH_3$) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) | : P(3HB) |
| | R = เอทธิล | ($C_2H_5$) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) | : P(3HV) |
| | R = โพรพิล | ($C_3H_7$) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) | : P(3HC) |
| | R = บิวทิล | ($C_4H_9$) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต) | : P(3HH) |
| | R = เพนทิล | ($C_5H_{11}$) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) | : P(3HO) |
| | R = เฮกซิล | ($C_6H_{13}$) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต) | :P(3HN) |
| | R = เฮปทิล | ($C_7H_{15}$) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดกคาโนเอต) | : P(3HD) |
| | R = ออกทิล | ($C_8H_{17}$) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีอันเดกคาโนเอต) | : P(3HUD) |
| | R = โนนิล | ($C_9H_{19}$) | สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดกคาโนเอต) | : P(3HDD) |
| เมื่อ n = 2 | R = ไฮโดรเจน | (H) | สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) | :P(4HB) |
| เมื่อ n = 3 | R = ไฮโดรเจน | (H) | สารนี้คือ พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) | : P(5HV) |

**รูปที่ 1** สูตรโครงสร้างของ PHA (Lee, 1996 (a),(b) ; Braunegg และคณะ, 1998)

*C คือ บีตาคาร์บอน

~ คือ พันธะเอสเทอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การจำแนกชนิดของ PHA

การจำแนกชนิดของ PHA สามารถแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA (Valentin และคณะ, 1994) เป็น 2 ประเภท คือ

1. โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ชนิดเดียวมาต่อกัน เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

2. เฮเทอร์โรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้

2.1 โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

2.2 เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

การจำแนกชนิดของ PHA สามารถแบ่งตามจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA (Doi และคณะ, 1995 ; Jendrossek และคณะ, 1996) เป็น 3 ประเภท คือ

1. Short chain length (SCL) PHA มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA เท่ากับ 3-5 อะตอม

2. Medium chain length (MCL) PHA มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA เท่ากับ 6-15 อะตอม

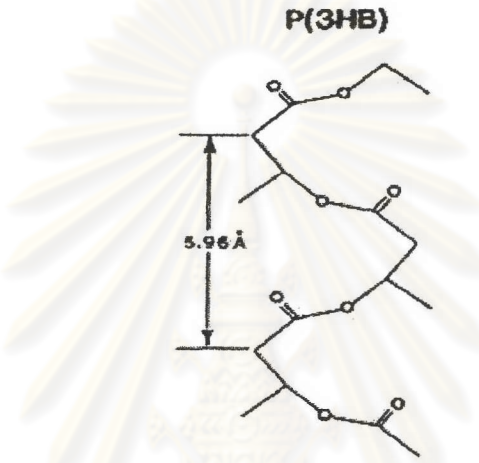
3. Long chain length (LCL) PHA มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA มากกว่า 15 อะตอม

## พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต), PHB

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต สูตรเคมีของ PHB คือ $[C_4H_6O_2]_n$ เป็นพอลิเมอร์ที่ค้นพบชนิดแรก โดย Lemoigne เมื่อปี 1925 สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด และเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากที่สุดในแบคทีเรีย

## โครงสร้างและสมบัติของ PHB

Cornibert และ Marchessault (1972) ศึกษาโครงสร้างผลึกของ PHB โดยใช้เทคนิค X-ray diffraction พบว่ารูปร่าง (conformation) ของโมเลกุล PHB เป็นแบบอัดตัวแน่น (compact) และเกลียวหมุนขวา มีหน่วยซ้ำ fiber repeat 0.596 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2




**รูปที่ 2** โครงสร้างผลึกของ PHB (Doi, 1990)

PHB มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก มีสถานะเป็นของแข็งคล้ายแก้ว (glassy state) ที่อุณหภูมิกราสทรานซิชัน (glass-transition) ประมาณ 4 องศาเซลเซียส เมื่อตกตะกอน PHB ด้วยสารละลายเจือจางจะได้ผลึกเป็นชั้นบางๆ ความหนาของชั้นผลึกขึ้นกับอุณหภูมิการเกิดผลึก (crystallization temperature) และน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ค่า Young's modulus และ tensile strength ของแผ่นฟิล์ม PHB ใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีน (PP)

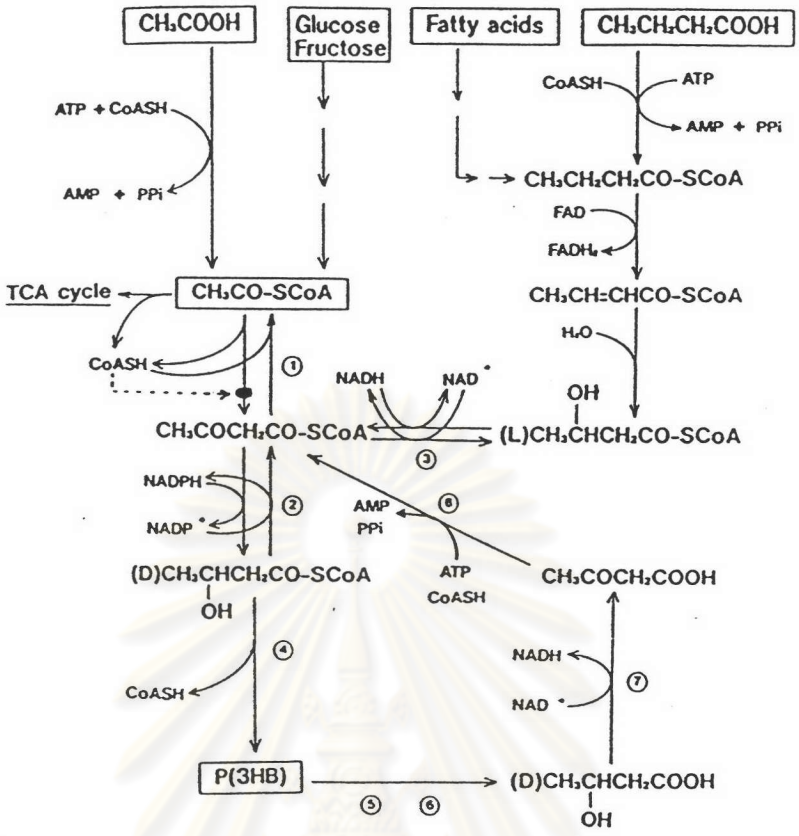
PHB ที่ผลิตได้จะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอน และภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Doi และคณะ, 1990)

## วิถีการสังเคราะห์ PHB

การสังเคราะห์และการควบคุมการสังเคราะห์ PHB มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในเชื้อ *Alcaligenes latus, Alcaligenes eutrophus, Zoogloea ramigera* และ *Azotobacter beijerinckii* Haywood และคณะ (1988) ศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ ในการผลิต PHB พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิต PHB ที่มีอะตอมคาร์บอน 4-5 หน่วย รวมทั้งเอนไซม์พอลิเมอเรส (polymerase) สามารถพอลิเมอไรซ์พอลิเมอร์เป็น R-configuration แต่ไม่พบ S-configuration (Tomita และคณะ, 1983)

กลไกการสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์เกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึม แสดงในรูปที่ 3 ซึ่ง PHB ถูกสังเคราะห์จากสารตั้งต้นคือ อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) โดยปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ 3-ketothiolase จะเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของอะซิติลโคเอ 2 โมเลกุล ให้เป็นอะซิโตอะซิติล โคเอ (Acetoacetyl-CoA) จากนั้นสารดังกล่าวนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็น ดี-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (D-(-)-3-hydroxybutyryl CoA) โดยการเร่งปฏิกิริยาของ NADPH/NADH-linked acetoacetyl-CoA reductase และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ไปเป็น PHB โดย PHB synthase (Anderson และ Dawes,1990; Doi,1990; Braunegg,1998)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 3** วิถีการสังเคราะห์และการย่อยสลาย PHB (Doi, 1990; Lee และคณะ, 1999)
**1)** 3-ketothiolase, **2)** NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductase, **3)** NADH-linked acetoacetyl-CoA reductase, **4)** PHB synthase, **5)** PHB depolymerase, **6)** R-(-)-3-hydroxybutyrate-dimer hydrolase, **7)** R-(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase, **8)** acetoacetyl CoA synthetase

ในภาวะที่จุลินทรีย์มีการเติบโตตามปกติ เกิดการคาตาบอไลซ์คาร์โบไฮเดรตผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) ได้เป็นไพรูเวต สามารถเปลี่ยนไปเป็นอะซิติลโคเอโดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (dehydrogenation) จากนั้นจะเข้าสู่วัฏจักร TCA ด้วยการปล่อย CoASH และถูกออกซิไดซ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์ กับพลังงานในรูป ATP และ reducing equivalent (NADPH, NADH และ $FADH_2$) จุลินทรีย์จะนำพลังงานและสารตั้งต้น (biosynthetic precursors) ที่ได้ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ปริมาณอะซิติลโคเอที่จะเข้าสู่วัฏจักร TCA ขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแร่ธาตุอื่นๆ จากรายงานการศึกษาของ Heinzle และ Lafferty

(1980) พบว่า *A. eutrophus* H16 จะเข้าสู่ระยะการเจริญ และมีการสังเคราะห์โปรตีนเมื่อมีปริมาณแอมโมเนียมเพียงพอ Oeding และ Schlegel (1973) พบว่าการที่อะซิติลโคเอจะถูกออกซิไดซ์ผ่านวัฏจักร TCA หรือเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB ขึ้นอยู่กับภาวะแวดล้อม จากรายงานผลการวิจัยของ Doi (1990); Braunegg (1998) พบว่าเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ และมีการจำกัดธาตุอาหารที่จำเป็น เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์จะสิ้นสุดลง ทำให้ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH เป็นผลให้อัตราส่วน NAD(P)H ต่อ NAD(P) สูงขึ้น มีผลไปยับยั้งเอนไซม์ citrate synthase ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่างออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) กับอะซิติลโคเอ เป็นซิเตรท (citrate) และให้โคเอ (CoA) ออกมา เมื่อเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งส่งผลให้เกิดการรวมกันของอะซิติลโคเอไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ โดยเอนไซม์อะซิติลโคเอ เอซิลทรานเฟอเรส (acetyl CoA acyltransferase) เข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB ดังนั้นอัตราการสังเคราะห์ PHB จะเพิ่มขึ้น เมื่อมีอะซิติลโคเอปริมาณมาก (Dawes และ Senior, 1973) นอกจากการจำกัดธาตุอาหารแล้ว ออกซิเจนก็เป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการสังเคราะห์ PHB จากรายงานการวิจัยของ Brivonese และ Sutherland (1989) เลี้ยงเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ในสภาวะที่มีการจำกัดปริมาณออกซิเจนบางส่วน ขณะที่มีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอ พบว่าเชื้อสามารถผลิต PHB ได้ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ถ้าเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้แก่ระบบจะส่งผลให้การผลิต PHB ลดลง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า สภาวะที่จำกัดปริมาณออกซิเจนอาจจะไม่ส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB สูงขึ้น เช่น ภายใต้สภาวะที่จำกัดปริมาณออกซิเจน *A. eutrophus* H16 สะสม PHB อัตราที่ต่ำกว่าการจำกัดปัจจัยอื่นๆ (Schlegel และคณะ, 1970)

**วิถีการย่อยสลาย PHB**

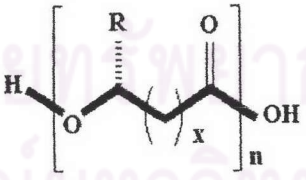
วิถีการย่อยสลาย PHB เกิดจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน (depolymerization) มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือเอนไซม์ PHB depolymerase ย่อยสลาย PHB ไปเป็นโมโนเมอร์ R3HB (Jendrossek และคณะ, 1993), โมโนเมอร์และไดเมอร์ของ R3HB (Schirmer และคณะ, 1993) หรือส่วนผสมของโอลิโกเมอร์ (Nakayama และคณะ, 1985) ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ดีพอลิเมอเรส Doi และคณะ (1992) พบว่าเอนไซม์ PHB depolymerase มีความจำเพาะกับพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยของโมโนเมอร์ที่อยู่ในรูปของ (R)- configuration เท่านั้น ส่วนพอลิเมอร์ที่อยู่ในรูปของ (S)- configuration เอนไซม์ PHB depolymerase ไม่สามารถย่อยสลายได้ จากนั้นเอนไซม์ dimer hydrolase (oligomer hydrolase) จะช่วยย่อยโอลิโกเมอร์ให้เป็นโมโนเมอร์

(Delafield และคณะ, 1965 ; Shirakura และคณะ, 1983) เพื่อนำกลับเข้าไปใช้ในเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ PHB depolymerase จะมีความสำคัญกว่าเอนไซม์ dimer hydrolase (oligomer hydrolase) ส่วนเอนไซม์ R3HB dehydrogenase ทำหน้าที่เปลี่ยนโมโนเมอร์ R3HB เป็นอะซิโตอะซิเตต และเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอเข้าสู่วัฏจักร TCA เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ต่อไป (รูปที่ 3)

จากวิถีการย่อยสลาย PHB ดังกล่าว พบว่าการผลิตโมโนเมอร์ R3HB จะมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ เอนไซม์ PHB depolymerase และ dimer hydrolase กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เอนไซม์ R3HB dehydrogenase ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ให้ได้ปริมาณมาก จำเป็นที่จะต้องให้เอนไซม์ PHB depolymerase และ dimer hydrolase มีกิจกรรมสูง ส่วนเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จะต้องมีกิจกรรมต่ำ หรือไม่มีเลย (Lee และคณะ,1999)

**กรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีคาร์บอกไซลิก [R-(-)-3-Hydroxycarboxylic acid]**

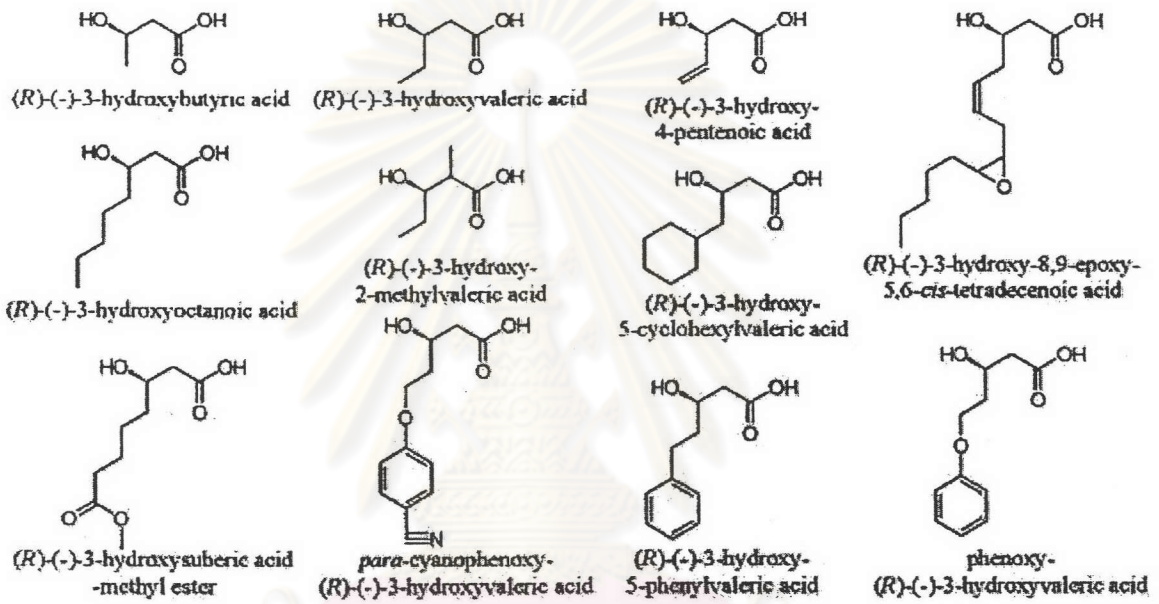
กรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีคาร์บอกไซลิกนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ เช่น ยาปฏิชีวนะ วิตามิน อะโรมาติก ฟีโรโมน (Ohashi และ Hasegawa, 1992; Lee และคณะ, 1999) ยาฆ่าแมลง และสารต้านไวรัส (Burke และคณะ, 1999; Peypoux และคณะ, 1999) สารกลุ่มนี้มี chiral center เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 4 ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซี (OH) และหมู่คาร์บอกซีลิก (COOH) ซึ่งง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี จึงนำไปสังเคราะห์สารประกอบชนิดใหม่ตามที่ต้องการได้โดยตรง




**รูปที่ 4** โครงสร้างของกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีคาร์บอกไซลิก [R-(-)-3Hydroxycarboxylic acid]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 5 เนื่องจากอะตอมคาร์บอนบริเวณหมู่ไฮดรอกซีของกรดเหล่านี้เป็น chiral center สามารถพอลิเมอไรซ์เป็นพอลิเมอร์ได้ (Lee, 1996(b); Steinbuchel และ Valentin, 1995) พอลิเมอร์ดังกล่าวนี้คือ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHAs) โมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของ PHA มีหมู่ R ที่แตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิต PHA และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHA โมโนเมอร์ที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ กรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก [R-(-)-3-Hydroxybutyric acid, (R3HB)]

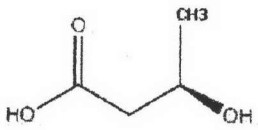



**รูปที่ 5** ตัวอย่างโมโนเมอร์ชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของPHA (http://mbel.kaist.ac.kr)

**กรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก [R-(-)-3-Hydroxybutyric acid, (R3HB)]**

กรด 3-ไฮดรอกซีบิวไทริก (3HB) เป็นสารในกลุ่มของกรดไฮดรอกซีคาร์บอกซีลิก มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซี และหมู่คาร์บอกซีลิก คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (ตำแหน่งบีตา) เป็น chiral center สามารถผลิตสารได้ 2 ไอโซเมอร์ คือ (R)-(-)- และ (S)-(-)-configuration ขึ้นกับความจำเพาะ (stereospecificity) ของเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้าง PHB จากรายงาน

การศึกษาของ Steinbuchel และ Valentin (1995) พบว่ากรด 3-ไฮดรอกซีบิวไทริกที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็น (R)-(-)-configuration ทั้งหมด โครงสร้างแสดงในรูปที่ 6 ประกอบด้วยคาร์บอน 3 ตัว หมู่ R คือ มีเทน ($CH_3$) ส่วน (S)-(-)-configuration สามารถผลิตได้ด้วยวิธีทางเคมี




**รูปที่ 6** โครงสร้างของกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก [R-(-)-3-Hydroxybutyric acid, (R3HB)]

กรดคาร์บอกซีลิกจำนวนมากกว่า 120 ชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ที่ตำแหน่ง 3-, 4-, 5- หรือ 6- ผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้งหมดอยู่ในรูป (R)-(-)-configuration

**การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ PHB depolymerase**

PHB เป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (biodegradable thermoplastics) โดยปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน อาศัยการทำงานของระบบเอนไซม์ PHB depolymerase ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase และเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase

จุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ออกมาย่อยสลาย PHB ที่มีอยู่ในธรรมชาติ (Chowdhury, 1963 ; Delafield และคณะ, 1965) ส่วนเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase จะย่อยสลาย PHB ที่สะสมภายในเซลล์ (Merrick และคณะ, 1964; Griebel และคณะ, 1968) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานของเซลล์ต่อไป Amov และคณะ (1991) พบว่าเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ไม่สามารถย่อยสลาย PHB ที่อยู่ในแกรนูลภายในเซลล์ได้ เช่นเดียวกับเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase ก็ไม่สามารถย่อยสลาย PHB ที่อยู่ภายนอกเซลล์ได้เช่นกัน เนื่องจากความแตกต่างด้านโครงสร้างทางกายภาพของ PHB ที่อยู่ภายนอก และภายในเซลล์ กล่าวคือ PHB ที่อยู่ภายนอกเซลล์จะมีความเป็นผลึกสูง ดีกรีความเป็นผลึกท่ากับ 50-60 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิหลอมเหลวเท่ากับ 170-180 องศาเซลเซียส ขณะที่ PHB ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ (native PHB) มีลักษณะเป็นแกรนูล

เป็นอสัณฐาน หรือไม่เป็นผลึก (amorphous) มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ $10^5$ - $10^6$ ดาลตัน และถูกห่อหุ้มด้วยชั้นของโปรตีนกับ phospholipids

**เอนไซม์** extracellular PHB depolymerase

เนื่องจาก PHB เป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ มีน้ำหนักโมเลกุลมาก ทำให้ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เข้าไปได้ ทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติจะปล่อยเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ออกมาย่อยสลาย PHB ให้เป็นโอลิโกเมอร์ หรือโมโนเมอร์ที่ละลายน้ำได้ แล้วนำกลับเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นสารอาหาร และเกิดการเมตาบอไลซ์ภายในเซลล์ ในสภาวะที่มีอากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ น้ำ, เมทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (Delafield และคณะ, 1965)

เอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ได้ถูกแยกออกมาอยู่ในรูปของเอนไซม์บริสุทธิ์จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Pseudomonas* sp. strain P1 (Chowdhury, 1963) *Pseudomonas lemoignei* (Lusty, 1966; Nakayama และคณะ, 1985) *Alcaligenas faecalis* T1 (Tanio และคณะ, 1982; Shirakura และคณะ, 1986; Fukui และคณะ, 1988) *Penicillium pinophilum* (Brucato และคณะ, 1991) จากรายงานการศึกษาของ Mukai และคณะ (1993) แยกเชื้อ *Comamonas testosteroni* จากน้ำทะเล พบว่าสามารถปล่อยเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ออกมาได้ ซึ่งเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase จากเชื้อ *C. testosteroni* มีความแตกต่างจากเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ของเชื้อชนิดอื่น เนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีขั้ว (hydrophobicity) สูงมาก ส่งผลให้สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของพอลิเมอร์ในธรรมชาติได้ดี Quinteros และคณะ, (1999) รายงานว่าการทำงานของเอนไซม์ PHB depolymerase จะมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นโดยจะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ PHA และโอลิโกเมอร์ของพอลิเมอร์ PHA เท่านั้น นอกจากนี้ Yamada และคณะ (1993) ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PHB พบว่า *Pseudomonas pickettii* สามารถเติบโตได้ในแหล่งคาร์บอนหลายชนิด แต่ 3HB ที่เป็นองค์ประกอบใน PHB เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการปล่อยของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ออกมาย่อยสลาย PHB ที่เป็นแหล่งคาร์บอนภายนอกเซลล์ เอนไซม์นี้มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส, pH 5.5 ผลผลิตหลักที่ได้คือ โมโนเมอร์ R3HB และเอนไซม์นี้จะไม่มีกิจกรรมถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียสขึ้นไป และที่ค่า pH สูงกว่า 10

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ของเชื้อ *Pseudomonas stutzeri* ที่แยกมาจากน้ำทะเล โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี PHB, R3HB และ

S3HB เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถเติบโตได้ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด แต่สามารถปล่อยเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ได้ในอาหารที่มี PHB และ R3HB เท่านั้น ภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์นี้คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH 7.4 ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือโมโนเมอร์ และไดเมอร์ของ R3HB แต่ในอาหารที่มี S3HB เป็นแหล่งคาร์บอนจะไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ หลังจากทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 60 kDa (Uefuji และคณะ, 1997)

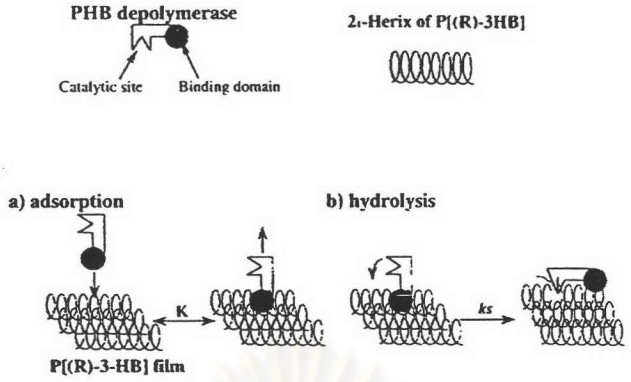
Kumar และคณะ (2000) พบว่าเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase จากเชื้อ *Pseudomonas lemoignei* มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย a large catalytic domain, a linking domain และ a C-terminal substrate-binding domain บริเวณเร่งอยู่บริเวณ catalytic domain เป็น serine residue และพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีกิจกรรมคล้ายกับเอนไซม์ไลเปส (lipase)

Zhang และคณะ (1992) รายงานการวิจัยกิจกรรมของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ของเชื้อ *Alcaligenas faecalis* T1 พบว่าเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ถูกชักนำด้วยแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ PHB กรดไฮดรอกซีบิวไทริก และกลูโคส นอกจากนี้ Fukui และคณะ (1988,1993) พบว่าโครงสร้างของเอนไซม์นี้ประกอบด้วย

1. hydrophobic domain มีขนาด 5 kDa ทำหน้าที่เป็น binding site จับกับสารตั้งต้นที่เป็นสารไม่ชอบน้ำ (hydrophobic substrate) เช่น บริเวณพื้นผิวของ PHB

2. catalytic domain เป็นบริเวณเร่ง ทำหน้าที่ย่อยสลายสารตั้งต้น

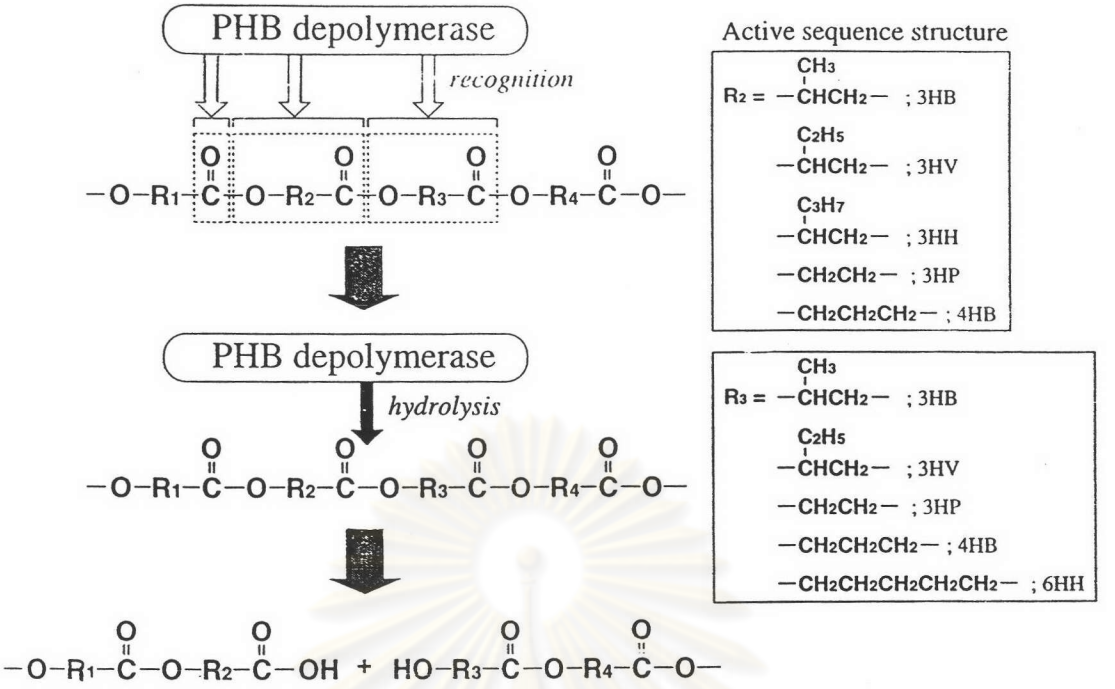
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 7** กลไกการทำงานของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ที่ผิวแผ่นฟิล์ม PHB (Kasuya และคณะ, 1995)

จากรูปที่ 7 Kasuya และคณะ (1995) ศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase จากเชื้อ *Alcaligenas faecalis* T1 มี 2 ขั้นตอนคือ adsorption เป็นการยึดเกาะของเอนไซม์ที่พื้นผิวของแผ่นฟิล์ม PHB โดยตำแหน่งของ binding site ของเอนไซม์ จากนั้นจะเกิด hydrolysis ของสายพอลิเมอร์ PHB บริเวณเร่งของเอนไซม์ ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ พบว่าเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase มีกิจกรรมสูงสุดที่ 37 องศาเซลเซียส, ค่า pH เท่ากับ 7.4 ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ ไดเมอร์ของ 3HB อัตราส่วนของโมโนเมอร์ต่อไดเมอร์ที่ได้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase ที่ทำปฏิกิริยา

Kita และคณะ (1995) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase จาก *Alcaligenas faecalis* AE122 พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยหน่วยของโมโนเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 95.5 kDa กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นอยู่กับ serine residue ที่บริเวณเร่งเอนไซม์นี้มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส, pH 9.0 ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือไดเมอร์และไตรเมอร์ของ R3HB จากรายงานการวิจัยของ Abe และ Doi (1999) พบว่าโครงสร้างทางเคมีของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ และลำดับการเรียงตัวของโมโนเมอร์มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase จากเชื้อ *Alcaligenas faecalis*



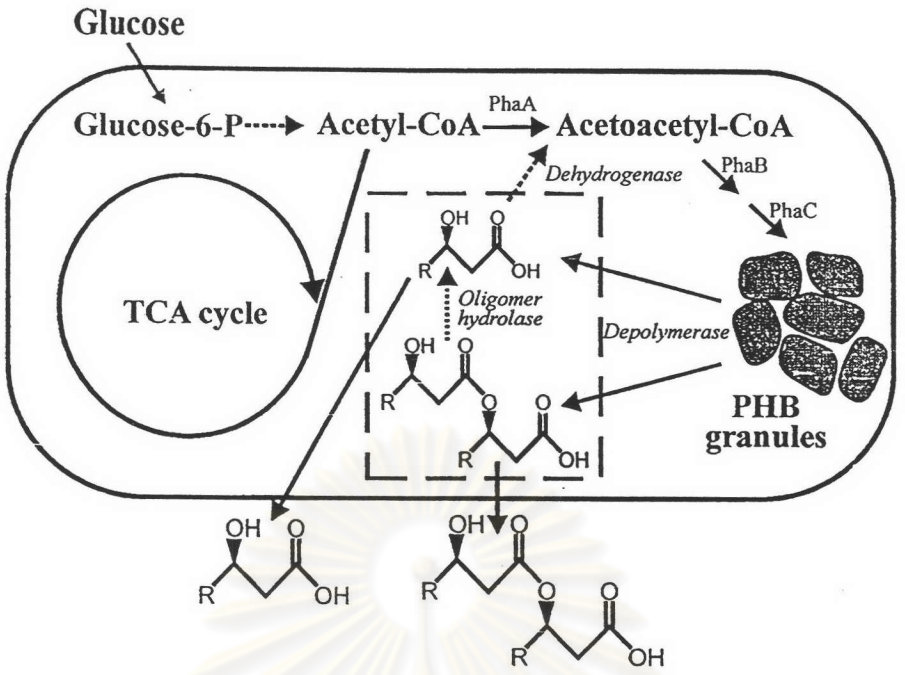

**รูปที่ 8** แบบจำลองการทำงานของเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase (Abe และ Doi, 1999)

จากรูปที่ 8 พบว่าเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase จากเชื้อ *Alcaligenas faecalis* จะจดจำหน่วยของโมโนเมอร์อย่างน้อยที่สุด 3 หน่วย เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการไฮโดรไลซิสพันธะเอสเทอร์ในสายพอลิเมอร์แบบสุ่ม ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีหลายชนิด อัตราการทำปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ extracellular PHB depolymerase จะจับกับสารตั้งต้นที่หมู่คาร์บอนิลของ R1 ด้านปลายของหมู่ไฮดรอกซี ความยาวของคาร์บอนที่ต่อกันในโมโนเมอร์ และ R2 ก็มีความสำคัญไม่ควรยาวเกินไป เพื่อความสะดวกต่อการจับกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ ส่วนโมโนเมอร์ R3 เป็นตำแหน่งที่บริเวณเร่งจะเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสารตั้งต้น ผลผลิตหลักที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์นี้คือ ไดเมอร์ของ R3HB และพบโมโนเมอร์ R3HB เพียงเล็กน้อย

**เอนไซม์** intracellular PHB depolymerase

นอกจากเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase จุลินทรีย์ทุกชนิดที่สามารถสร้างและสะสม PHB จะมีเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase เพื่อย่อยสลาย PHB ที่อยู่ภายในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในภาวะที่เซลล์ขาดแคลนสารอาหาร เช่น *Ralstonia eutropha* (Hippe, 1967) *Legionella pneumophila* (James และคณะ, 1999) *Hydrogenophaga pseudoflava* (Yoon และคณะ, 1999) Handrick และคณะ (2000) พบว่ากลไกการทำงานของเอนไซม์ intracellular PHA depolymerase ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด จึงศึกษาเอนไซม์ intracellular PHA depolymerase ในระดับยีน เมื่อตัดต่อยีนเอนไซม์ intracellular PHA depolymerase ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* เข้าไปใน *E. coli* ทำให้ *E. coli* สามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้ จากรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ (2003) ศึกษากลไกการสร้างและการย่อยสลาย PHB ที่เกิดจากการตัดต่อยีนเอนไซม์ intracellular PHA depolymerase ของ *Ralstonia eutropha* เข้าไปใน *E.coli* เพื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อ *E.coli* ในอาหาร complex medium กับอาหาร chemically defined medium พบว่าในอาหาร complex medium เชื้อ *E.coli* สามารถผลิต PHB ได้สูงกว่าในอาหาร chemically defined medium แต่การผลิตโมโนเมอร์ R3HB ในอาหาร chemically defined medium พบว่าผลิตได้ 9.6 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 48.0 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้น ซึ่งมากกว่าในอาหาร complex medium ที่ผลิตได้ 8.3 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 41.5 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้น จากนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อ *E.coli* ในอาหาร chemically defined medium ระดับถังหมัก เชื้อสามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB และปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ 49.5 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณกลูโคสเริ่มต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 9** กลไกการสร้าง PHB และการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ใน *E. coli* (Lee และคณะ, 2003)

PhaA ; ß-ketothiolase

PhaB ; acetoacetyl-CoA reductase

PhaC ; PHA synthase

จากรูปที่ 9 เมื่อเซลล์ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสังเคราะห์และสะสมเป็น PHB แล้ว เอนไซม์ intracellular PHB depolymerase จะดีพอลิเมอไรซ์พอลิเมอร์เป็นโมโนเมอร์ หรือ ไดเมอร์ ของ R3HB และปล่อยออกนอกเซลล์ ต่อมายังมีการศึกษาการทำเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase จาก *Ralstonia eutropha* ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ (Kobayashi และคณะ, 2003)

จากรายงานการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase ในการผลิต R3HB ที่ผ่านมา จะเห็นว่าค่อนข้างยุ่งยาก และได้ปริมาณโมโนเมอร์น้อย Lee และคณะ (1999) ได้ศึกษาวิธีการที่ง่ายและมีประสิทธิภาพสำหรับการผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยวิธีดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ (in vivo depolymerization) ของ *Alcaligenes latus* DSM1123 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase พบว่าการบ่ม

เชื้อที่สะสม PHB ภายในเซลล์เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB (11.3 กรัมต่อลิตร) สูงกว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส และเมื่อปรับค่า pH เริ่มต้นสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันในช่วงเท่ากับ 2-11 พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 4.0 ให้ผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB สูงที่สุดเท่ากับ 96 mol%

นอกจากนี้ Lee และคณะ (1999) ได้ศึกษาปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เพื่อการผลิตกรดอาร์-(-)-3-คาร์บอกซิลิกชนิดอื่นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น ศึกษาปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ของ *Ralstonia eutropha* ที่มีการสร้าง และสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) เมื่อนำเซลล์ไปทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรเซชัน ภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาคือ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 35 ชั่วโมง พบโมโนเมอร์ R3HB 5.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 13.3 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น และโมโนเมอร์ R3HV 0.6 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 1.38 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น เมื่อศึกษาในเชื้อ *Pseudomonas oleovorans* สามารถสะสมโคพอลิเมอร์ ($PHH_xOD$) นำเซลล์ไปทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรเซชันพบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาคือ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 4 วัน พบโมโนเมอร์ $R3HH_x$ เท่ากับ 0.13 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 9.2 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHA เริ่มต้น โมโนเมอร์ R3HO 1.42 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 9.7 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHA เริ่มต้น

จากรายงานผลการศึกษาดังกล่าวนี้ ทำให้ทราบถึงปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเอนไซม์ Intracellular PHB depolymerase ภายในเซลล์จุลินทรีย์ในการผลิตโมโนเมอร์กรดอาร์-(-)-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ได้แก่ อุณหภูมิ และค่า pH สำหรับการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน รวมทั้งกลไกในปฏิกิริยาของเชื้อแต่ละชนิดก็แตกต่างกัน ทำให้ผลผลิตที่ได้แตกต่างกัน

## การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PHB depolymerase

ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ PHB depolymerase ทำหน้าที่คะตะไลซ์ปฏิกิริยาการเปลี่ยน PHB ไปเป็นโอลิโกเมอร์, ไดเมอร์ หรือโมโนเมอร์ ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ PHB depolymerase วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ Kasuya และคณะ (1995) พบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโมโนเมอร์ และไดเมอร์ของ 3HB จากปฏิกิริยาการย่อยสลายแผ่นฟิล์ม PHB ด้วยเอนไซม์ extracellular PHB depolymerase โดยวิธี spectrometry ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ 3HB จะวัดจากหน่วยของโมโนเมอร์ 3HB โดยไม่ขึ้นกับความยาวของสายพอลิเมอร์ แต่ขึ้นกับหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ของโมโนเมอร์กับไดเมอร์ (Mukai และคณะ, 1993) ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ในสารผสมปฏิกิริยา

ภายหลังการทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันแล้ววิเคราะห์ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

**เอนไซม์ R3HB dehydrogenase**

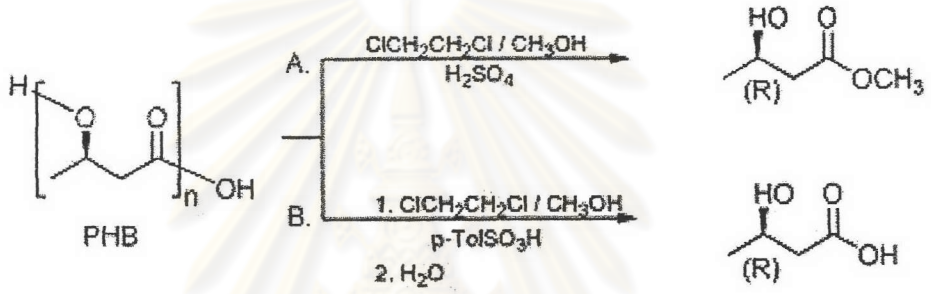
เอนไซม์ R3HB dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คะตะไลซ์ปฏิกิริยาการเปลี่ยนโมโนเมอร์ R3HB ไปเป็นอะซิโตอะซิเตต เพื่อเปลี่ยนเป็นอะซิติล-โคเอ เข้าสู่วัฏจักร TCA (Senior และ Dawes, 1973) ซึ่งมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เพื่อให้ได้ผลเป็นโมโนเมอร์ R3HB เนื่องจากถ้าเอนไซม์ R3HB dehydrogenase มีกิจกรรมสูง ทำให้โมโนเมอร์ R3HB ที่ผลิตได้ลดลง จากรูปที่ 3 สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้จาก NADH ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ดังนั้นจำเป็นต้องให้กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้มีน้อย หรือไม่มีเลยขณะที่เกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เพื่อให้ได้ผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB สูงที่สุด จากรายงานการวิจัยของ Delafield และคณะ (1965) พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase ของเชื้อ *Pseudomonas lemoignei* เท่ากับ 8.0 Lee และคณะ (1999) พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase คือค่า pH ขณะทำปฏิกิริยา พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase ของ *Alcaligenes latus* เท่ากับ 7.0 และที่ค่า pH เท่ากับ 4.0 ให้ผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB สูงที่สุดเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์โมล เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ PHB depolymerase สูงที่สุด แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase เท่ากับ 0 หรือหมายถึงที่ค่า pH เท่ากับ 4.0 ไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ R3HB dehydrogenase จึงไม่เกิดการคะตะไลซ์ปฏิกิริยาการเปลี่ยนโมโนเมอร์ R3HB ไปเป็นอะซิโตอะซิเตต

**การผลิตโมโนเมอร์ R3HB สามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ**

**1. วิธีทางเคมี**

Seebach และคณะ, (1992); Hasegawa และคณะ, (1990) ผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยใช้ปฏิกิริยา acidic alcoholysis ของ PHB ด้วยกรดซัลฟูริก จากรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ (2000) ศึกษาการผลิต alkyl R3HB โดยปฏิกิริยา acidic alcoholysis ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แทนการใช้กรดซัลฟูริก เนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกมีความเป็นกรดสูงกว่า เมื่อใช้กรดในปริมาตรที่เท่ากัน รวมทั้งมีราคาถูกกว่ากรดซัลฟูริก พบว่าเมื่อใช้ PHB เริ่มต้น 1 กรัม

สามารถผลิตเป็นสารประกอบเมทิลของ R3HB ได้ 0.93 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 93 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น Seebach และคณะ (1992) พบว่าสามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB และสารในรูปของเมทิลเอสเทอร์ ปฏิกิริยาแสดงในรูปที่ 10 กล่าวคือใช้ PHB เริ่มต้น 50 กรัม (0.58 โมล) ในปฏิกิริยาข้อ A เป็นการผลิตสารในรูปเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ R3HB [(R)-(-)-methyl-3-hydroxybutanoate] หลังจากทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 วันจะได้ผลผลิตเป็นสารในรูปเมทิลเอสเทอร์ 48 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น ส่วนในปฏิกิริยาข้อ B เป็นการผลิตโมโนเมอร์ R3HB หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วจะได้ผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB 32 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 53 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น




**รูปที่ 10** การผลิตโมโนเมอร์และสารในรูปเมทิลเอสเทอร์ของ R3HB โดยวิธีทางเคมี (Seebach และคณะ, 1992)

จากรายงานการวิจัยของ Roo และคณะ (2002) พบว่าสามารถผลิตกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีคาร์บอกไซลิก และสารที่อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ด้วยการสกัดจาก PHB ที่สร้างจาก *Pseudomonas putida* ด้วยตัวทำละลายและไฮโดรไลซ์ด้วยปฏิกิริยา acid methanolysis วิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟี พบว่าได้โมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลายชนิด

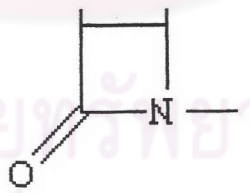
การผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยวิธีทางเคมี เป็นวิธีที่ยังไม่ได้รับความนิยมในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากเหตุผลทางเศรษฐกิจ ซึ่งจะได้ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ต่ำ ต้องใช้สารเคมีปริมาณมาก ขั้นตอนการผลิตยุ่งยาก ซับซ้อน ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาที่รุนแรงและอันตราย รวมทั้งใช้เวลาในการผลิตนาน ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่คุ้มทุน แต่อย่างไรก็ตามก็มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Holenes และคณะ, 1982; Seebach, 1992; Lafferty, 1984)

**2. วิธีทางชีวภาพ**

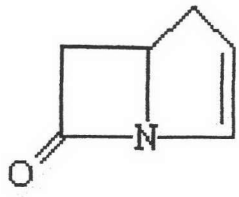
จุลินทรีย์ที่ผลิต และสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์จะสะสมอยู่ในรูปของแกรนูล โดยอาศัยระบบเอนไซม์พอลิเมอเรส ในการสร้างและสะสมพอลิเมอร์ พบว่ามีการสะสมแกรนูลสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Madison, 1999) จากนั้นเมื่อเซลล์ต้องการพลังงานจะใช้ระบบเอนไซม์ดีพอลิเมอเรส ในการย่อยสลาย PHA ใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ เพื่อการดำรงชีวิตต่อไป

**การประยุกต์ใช้โมโนเมอร์ R3HB**

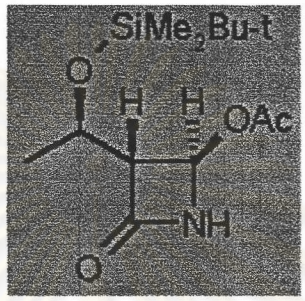
โมโนเมอร์ R3HB นำไปใช้เป็นสารตั้งต้น chiral building block ในการสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ เป็นหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบในการทำให้เกิด chiral center ชนิดใหม่ๆ (Seebach และคณะ, 1982) จากรายงานการศึกษาของ Sedelmeier และคณะ (1990) พบว่าโมโนเมอร์ R3HB สามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ thienamycin ในกลุ่มของยาปฏิชีวนะ β-lactam (รูปที่ 11) Chiba และ Nakai (1985) พบว่าโมโนเมอร์ R3HB เป็นสารตั้งต้นในการผลิต carbapenems (รูปที่ 12) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ β-lactam Lee และคณะ (2003) พบว่าโมโนเมอร์ R3HB เป็นสารตั้งต้นในการผลิต 4-acetoxyazetidinone ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม azetidinone ซึ่งมียอดขายมูลค่าเป็นพันล้านดอลลาร์ โครงสร้างแสดงในรูปที่ 13




**รูปที่ 11** โครงสร้างทางเคมีของ β-lactam ring

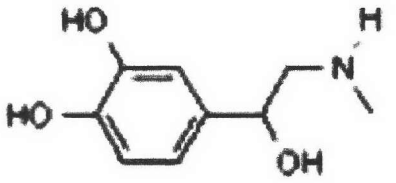



**รูปที่ 12** โครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม carbapenem

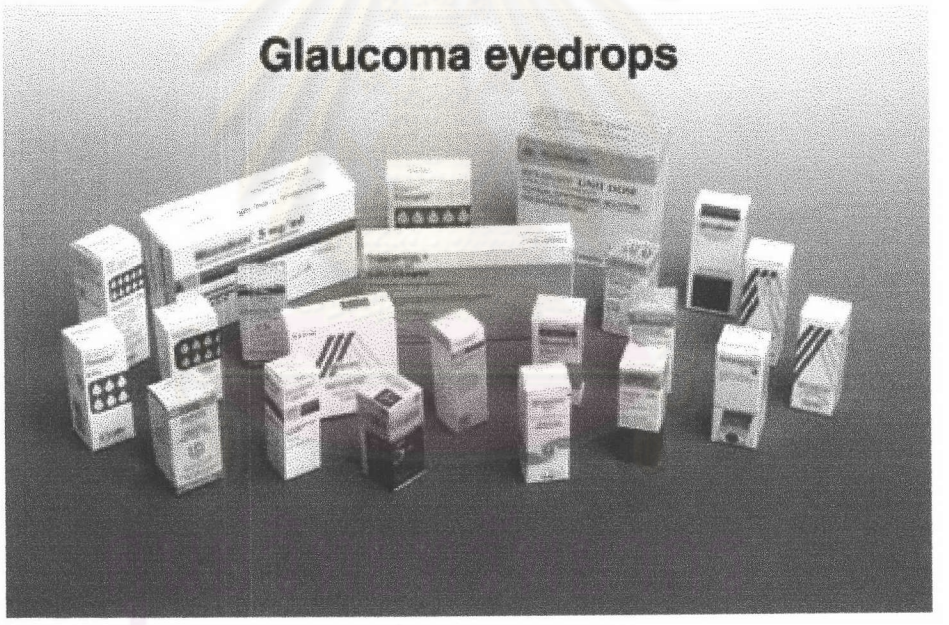



**รูปที่ 13** โครงสร้างทางเคมีของ azetidinone

โรค glaucoma (โรคต้อหิน) เป็นกลุ่มอาการของโรคที่ทำลายประสาทตา (optic nerve) อันมีสาเหตุมาจากช่องถ่ายเทน้ำ (drainage channels) ในลูกตาอุดตัน น้ำภายในลูกตาไม่สามารถถ่ายเทออกไปได้ ทำให้ความดันภายในลูกตาสูง ส่งผลให้ระบบประสาทตาถูกทำลาย หากไม่ได้รับการรักษาอาจทำให้ตาบอดได้ เนื่องจากเป็นโรคที่ไม่แสดงอาการจนกว่าเมื่อระบบประสาทถูกทำลายมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ จึงจะสังเกตเห็นว่า การมองเห็นผิดปกติ จากรายงานผลการวิจัยของ Fishman และคณะ (2001) พบว่ายาในกลุ่ม antiglaucoma เป็นยาหยอดตารักษาโรค glaucoma ช่วยลดความดันภายในลูกตา มีการใช้โมโนเมอร์ R3HB เป็นสารมัธยันต์ในการสังเคราะห์ยาในกลุ่มนี้ โครงสร้างแสดงในรูปที่ 14 ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ (รูปที่ 15) เช่น ยา xalatan ผลิตในประเทศสหรัฐอเมริกา




**รูปที่ 14** โครงสร้างทางเคมีของยา xalatan รักษาโรคต้อหิน (glaucoma)




จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**รูปที่ 15** ตัวอย่างยารักษาโรคต้อหิน (glaucoma)