

## บทที่ 2

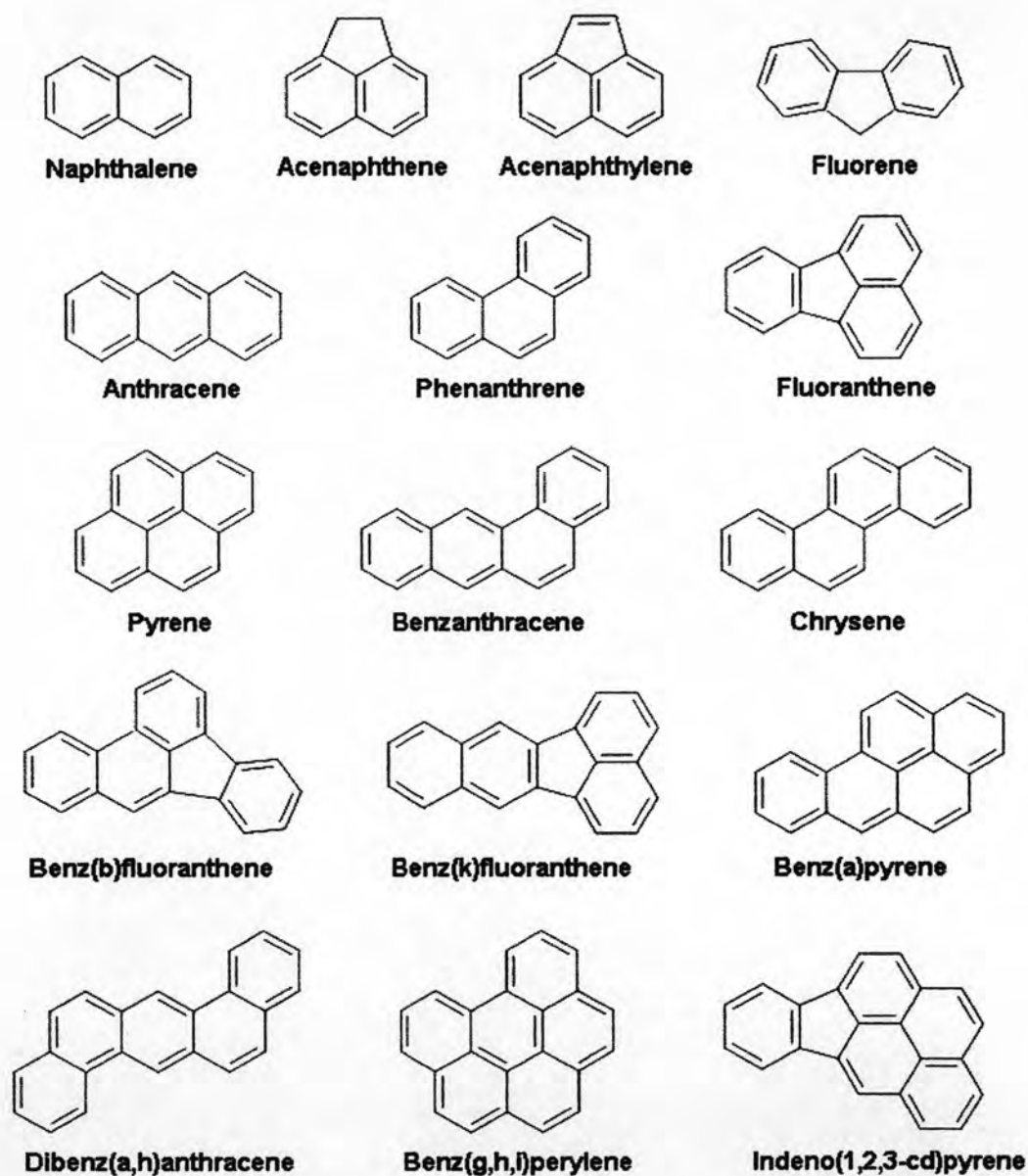
### ปรีทัศน์วรรณกรรม

สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นกลุ่มสารเคมีที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงอะโรมาติก ตั้งแต่ 2 วงเชื่อมต่อกัน ลักษณะการเชื่อมต่อกัน คือ วงอะโรมาติก 2 วงที่อยู่ติดกันต้องใช้คาร์บอน 2 อะตอมร่วมกัน วงอะโรมาติกอาจมีคาร์บอน 5 หรือ 6 อะตอมก็ได้ PAHs ประกอบด้วยสารที่มีสูตรโครงสร้างหลักแตกต่างกัน 35 ชนิด และแต่ละสูตรโครงสร้างหลักประกอบด้วยอนุพันธ์ต่างๆ PAHs เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในแหล่งน้ำ ดิน และอากาศซึ่งเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ตามธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมันดิบ ถ่านหิน รวมทั้งปรากฏอยู่ในควันจากภูเขาไฟ และยังเกิดจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ เช่น การเผาไหม้เชื้อเพลิงในชีวิตประจำวัน การติดเครื่องยนต์ เมื่อสาร PAHs ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จะตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานเนื่องจากมีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียรและโดยปกติในธรรมชาติจะอยู่ในสถานะของแข็ง ละลายน้ำได้น้อยมาก รวมทั้งถูกดูดซับโดยสารอินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สลายตัวได้เองตามธรรมชาติช้ามาก (Grosser และคณะ, 1991)

สาร PAHs รวม 16 ชนิด เช่น แนพทาลีน ฟิแนนทรีน ฟลูออแรนธินและไพรีน เป็นต้น เป็นสารก่อมลพิษที่สำคัญซึ่ง The United State Environment Protection Agency (USEPA) จัดให้อยู่ในกลุ่มของสารก่อมลพิษที่ต้องกำจัดออกจากสิ่งแวดล้อมอย่างเร่งด่วน (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 สามารถแบ่งสารประกอบ PAHs ตามขนาดโมเลกุลได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่ม PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเป็น PAHs ที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2-3 วง และกลุ่ม PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงเป็น PAHs ที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติกตั้งแต่ 4 วงขึ้นไป

การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ PAHs อาจเกิดจากกระบวนการทางกายภาพ เคมี และทางชีวภาพ (Ashok และ Saxena, 1995) โดยกระบวนการทางชีวภาพโดยอาศัยการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการสำคัญในการกำจัดหรือลดความเป็นพิษของสาร PAHs ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มจะมีกลไกเฉพาะและแตกต่างกันในการย่อยสลาย การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเกิดขึ้นได้ง่ายกว่ากลุ่มที่มีมวลโมเลกุลสูง ดังนั้นการย่อยสลายสาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงด้วยวิธีทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์อาจต้องอาศัยกิจกรรมร่วมกัน หรือกระบวนการโคเมตาบอลิซึม (Bouchez และคณะ, 1995) การศึกษาถึงกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย PAHs จึงมีความสำคัญต่อการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับเลือกจุลินทรีย์ที่มี

ประสิทธิภาพมาใช้ในระบบการเร่งการย่อยสลายตามธรรมชาติ (bioremediation) หรือปรับ  
 ภาวะเพื่อควบคุมให้จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพเพื่อกำจัดสารประกอบ PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสารประกอบ PAHs 16 ชนิด

## 2.1 อะซีแนฟีน

อะซีแนฟีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม PAHs มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนที่รวมกันเป็นอะโรมาติก โดยมีวงเบนซีน 2 วงและไซโคลเพนเทน 1 วงมีการเรียงตัวเป็นกลุ่ม (cluster arrangement) และมีสมบัติทางเคมีและกายภาพดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงสมบัติทางเคมีและกายภาพของอะซีแนฟีน

สมบัติ	อะซีแนฟีน
สูตรโมเลกุล	$C_{12}H_{10}$
น้ำหนักโมเลกุล	154.22
ชื่อสามัญ	อะซีแนฟีน (acenafeno)
หมายเลขสากลทางเคมี (CAS Number)	83-32-9
ความถ่วงจำเพาะ	1.189
จุดหลอมเหลว ( $^{\circ}C$ )	95
จุดเดือด ( $^{\circ}C$ )	279
พลังงานเรโซแนนซ์	7.76
ความดันไอ (มิลลิเมตรปรอท) ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}C$	3
การละลาย (มิลลิกรัม/ลิตร) ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}C$	4.3
$\text{Log}k_{ow}$	3.2
Henry's law constant (บรรยากาศ x ลูกบาศก์เมตร/ลิตร)	$1.46 \times 10^{-4}$
ลักษณะปรากฏ	เป็นผลึกสีขาว

หมายเหตุ :  $\text{log}k_{ow}$  = ค่า log ของ *n*-octanol-water partition coefficient

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ, 2547

### 2.1.1 แหล่งกำเนิดอะซีแนพทีน

พบอะซีแนพทีนเป็นส่วนประกอบของน้ำมันดินจากถ่านหิน 1,700-1,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำมันดิบ จากปิโตรเลียมมี 147-348 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำมันดิบ ควันบู่หรือ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี ผลิตภัณฑ์จากถ่านหิน เกิดจากการเผาไหม้และกระบวนการไพโรไลซิสของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Jones และคณะ, 1989) ไอเสียรถยนต์ นอกจากนี้พบอะซีแนพทีนจากของเสียที่ปล่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ถนนและรักษาเนื้อไม้ (Wilson และ Jones, 1993) ปิโตรเคมีและยาฆ่าแมลง เนื่องจากการนำอะซีแนพทีนมาใช้ในการผลิตสารเคมี เช่น แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ หรือใช้ผลิตสี พลาสติก และยาฆ่าแมลง (U.S. EPA อ้างโดย Pothuluri และคณะ, 1992) จากการนำอะซีแนพทีนไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมดังกล่าว การขนส่ง การดูแลรักษา รวมถึงการกำจัดกากของเสียจากอุตสาหกรรม ทำให้อะซีแนพทีนปนเปื้อนในอากาศ ดิน แหล่งน้ำผิวดิน และน้ำใต้ดิน (Mattox และ Humenick, 1980) ในประเทศไทยพบการปนเปื้อน อะซีแนพทีนและ PAHs ชนิดอื่น ในน้ำทะเลบริเวณอุตสาหกรรมแปรสภาพเรือเหล็กเก่ามาบตาพุด จังหวัดระยอง (พรศรี สุนทวนารักษ์, 2533) และในอากาศเขตกรุงเทพมหานครพบปริมาณสูงในบริเวณเส้นทางจราจร โดยสาร PAHs ถูกดูดซับโดยฝุ่นละอองขนาดเล็ก (กรมควบคุมมลพิษ, 2547)

### 2.1.2 ความเป็นพิษของอะซีแนพทีน

อะซีแนพทีนจัดเป็นสารที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง โดยที่ความเข้มข้น 413 ไมโครกรัมต่อลิตรทำให้ตัวอ่อนของปลา *Pimephales promelas* มีพฤติกรรมเฉื่อยชา (Cairns และ Nebeker, 1982) และความเข้มข้น 970 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำให้สัตว์น้ำตาย (Holcomb และ คณะ, 1983) การศึกษาความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ในหนู โดยให้อะซีแนพทีนปริมาณ 0-700 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน เข้าสู่กระเพาะอาหารติดต่อกันนาน 13 สัปดาห์ พบว่าหนูเพศผู้ไม่มีความผิดปกติ แต่หนูตัวเมียมีน้ำหนักของรังไข่ลดลงอย่างสอดคล้องกับการทำงานที่ลดลงของรังไข่และมดลูก (U.S.EPA, 1989) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยจะมีผลต่อเซลล์ตับและไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เกิดการกลายพันธุ์ในแมลง *Cadida scothii* (Imshenetskii และคณะ, 1985)

### 2.1.3 การสลายและการคงสภาพของอะซีแนพทีนในสิ่งแวดล้อม

การแตกสลายของอะซีแนพทีนในอากาศส่วนใหญ่เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแสง กับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl), แอลคอกซิล (Alkoxy) และเพอรอกซิล (peroxy) ทั้งนี้ปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลมีความสำคัญที่สุด ส่วนการแตกสลายของสารประกอบ PAHs ในน้ำผิวดิน น้ำใต้ดิน และ ดิน เกิดจากปฏิกิริยาการแตกสลายด้วยน้ำ การย่อยสลายโดยชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน และการแตกสลายโดยแสง มีรายงานแสดงค่าครึ่งชีวิตของอะซีแนพทีนในสิ่งแวดล้อมดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าครึ่งชีวิตของอะซีแนพทีนในสิ่งแวดล้อม

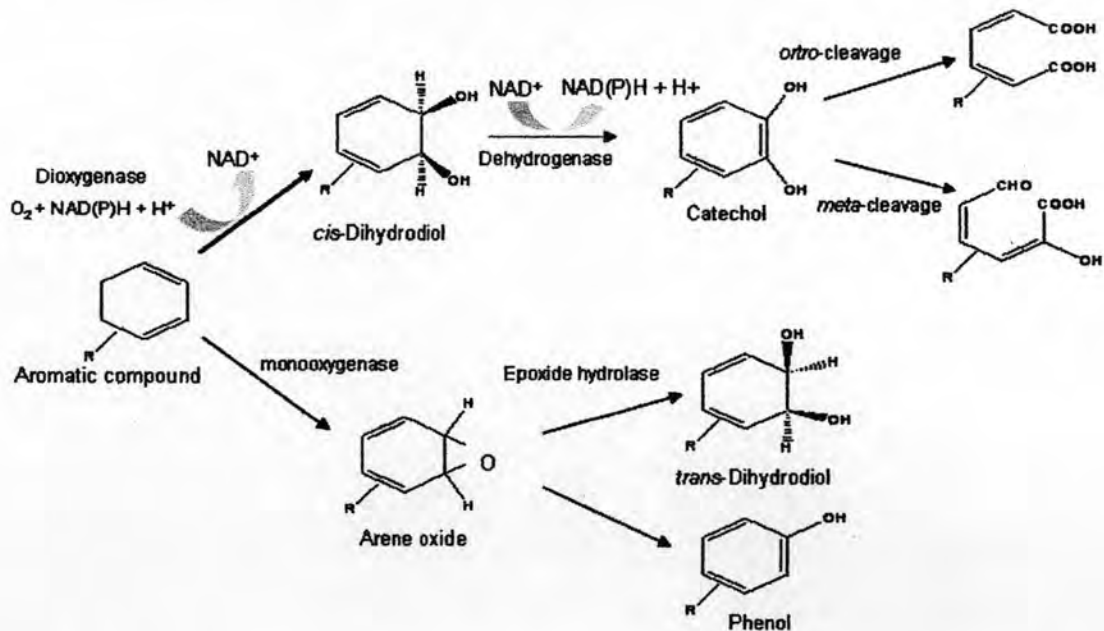
สิ่งแวดล้อม	ค่าครึ่งชีวิต (ชม.)	คำอธิบาย
อากาศ	0.879 – 8.79	คำนวณจากปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแสง (photooxidation)
ดิน	295 – 2,448 (12.3 วัน) (102 วัน)	คำนวณจากการศึกษาในคอลัมน์ดินแบบใช้ออกซิเจน (aerobic soil column test)
น้ำผิวดิน	3 – 300 (12.5 วัน)	คำนวณจากปฏิกิริยาการแตกสลายด้วยแสง (photolysis)
น้ำใต้ดิน	590 – 4,896 (24.6 วัน) (204 วัน)	คำนวณจากการย่อยสลายโดยชีวภาพในน้ำแบบใช้ออกซิเจน (aqueous aerobic biodegradation)

ที่มา : Howard และคณะ (1991)



## 2.2 กระบวนการย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย

การย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในภาวะที่มีออกซิเจนโดยจุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 2 วิธีคือ วิธีแรกซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นในแบคทีเรีย เริ่มจากการเติมออกซิเจนให้กับโมเลกุลที่พันธะคู่ เปลี่ยนเป็นซิสไดไฮโดรไดออล (*cis*-dihydrodiol) (Cerniglia, 1992) โดยการเร่งปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (multicomponent dioxygenase) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดยซิสไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส (*cis*-dihydrodiol dehydrogenase) ได้เป็นสารอนุพันธ์ประเภทไดไฮดรอกซิล แล้วสารตั้งต้นที่คล้ายแคทีคอล (catechol) จะถูกย่อยสลายด้วยไดออกซิจีเนสผ่านทางวิถีการแตกวงเบนซีนแบบ ออโร หรือ เมตา และเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Habe และ Omori, 2003) ในวิธีที่สองจุลินทรีย์บางชนิดจะให้โมโนออกซิจีเนสเติมออกซิเจน 1 อะตอม เข้ายังวงอะโรมาติกได้เป็นแอรีนอีพอกไซด์ (Arene oxide) จากนั้นเติมไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิลลงในโมเลกุลโดยกิจกรรมของอีพอกไซด์ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *ทรานส์*ไดไฮโดรไดออล (*trans*-dihydrodiol) หรืออีกวิธีหนึ่งมีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ได้เป็นอนุพันธ์ประเภทฟีนอล ดังแสดงในรูป 2.2



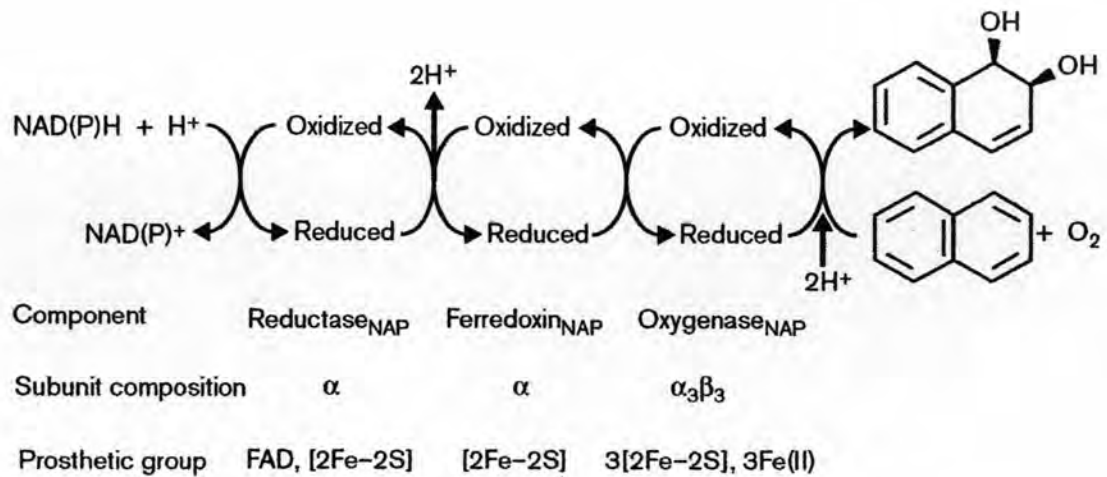
รูปที่ 2.2 วิธีกรย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั่วไปด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรียแบบใช้ออกซิเจน (Cerniglia, 1992)

## 2.2.1 วิธีการย่อยสลายแนพธาลิน

แนพธาลินเป็นสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างง่าย กล่าวคือประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงเชื่อมกัน จึงมีการใช้แนพธาลินเป็นต้นแบบในการศึกษาวิธีการย่อยสลายรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้อง ในวิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างซับซ้อนชนิดอื่น ดังนั้นรายงานที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะเน้นที่การศึกษาแ่งมุมต่างๆที่เกี่ยวกับการย่อยสลายแนพธาลินเป็นหลัก จากรายงานแรกของ Davies และ Evans (1964) ที่กล่าวถึงการย่อยสลายแนพธาลินโดย *Pseudomonas* sp. ต่อมา มีรายงานว่า *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลิน (Yen และ Serdar, 1982) โดยเริ่มจากการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังพันธะคู่ของวงอะโรมาติกได้เป็น ซิส-1,2-แนพธาลินไดไฮโดรไดออล (*cis*-1,2-naphthalene dihydrodiol) ด้วยกิจกรรมของแนพธาลินไดออกซิจีเนส (naphthalene dioxygenase) (Yen และ Serdar, 1988) ซึ่งประกอบด้วยระบบการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน (multicomponent enzyme system) ได้แก่ reductase<sub>NAP</sub> ferredoxin<sub>NAP</sub> และ terminal oxidase หรือ iron-sulfur flavoprotein (ISP<sub>NAP</sub>) ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยย่อยแอลฟา ( $\alpha$ -subunit, large subunit) และหน่วยย่อยบีตา ( $\beta$ -subunit, small subunit) (Ensley และ Gibson, 1983)

การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ของแนพธาลินไดออกซิจีเนสเริ่มจากการส่งผ่านของอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ไปยัง reductase<sub>NAP</sub> จากนั้นส่งต่อไปยัง ferredoxin<sub>NAP</sub> และ ISP<sub>NAP</sub> ตามลำดับ สุดท้าย ISP<sub>NAP</sub> จะเป็นส่วนที่เร่งปฏิกิริยาโดยตรงด้วยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมยังวงเบนซีนของแนพธาลินเกิดผลิตภัณฑ์ ซิส-1,2-แนพธาลินไดไฮโดรไดออล ดังแสดงในรูปที่ 2.3

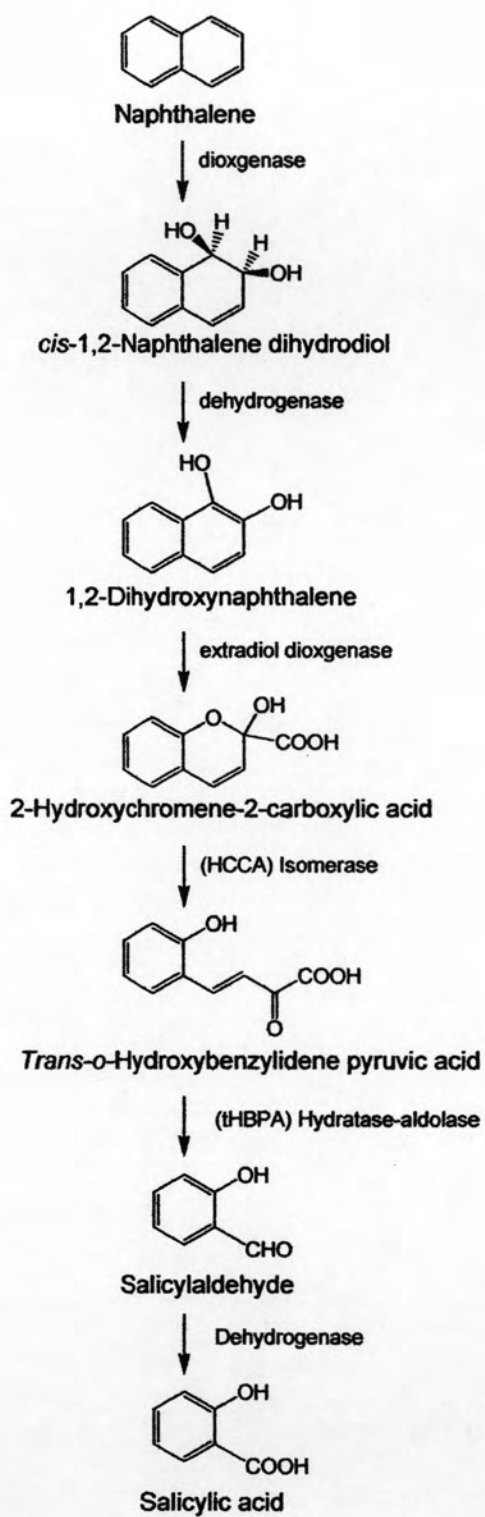
จากนั้น ซิส-1,2-แนพธาลินไดไฮโดรไดออล จะเปลี่ยนเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาลิน (1,2-dihydroxynaphthalene) และ กรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก (2-hydroxychromene-2-carboxylic acid, HCCA) ด้วยแอกติวิตีของแนพธาลินไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส และไดไฮดรอกซีแนพธาลินดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ จากนั้นกรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก จะถูกออกซิไดส์เป็น ทรานส์-ออร์โธ-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก (*trans*-o-hydroxybenzylidenepyruvic acid, tHBP) โดย HCCA ไอโซเมอไรส์ แล้วเปลี่ยนเป็น ซาลิไซแอลดีไฮด์ (salicylaldehyde) จนได้เป็นกรดซาลิไซลิกโดยการเร่งปฏิกิริยาของไฮดรอกซีแอลดีไฮด์ และซาลิไซลัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ ซึ่งเรียกวินี้ว่าวิธีการย่อยสลายส่วนบน (upper pathway) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



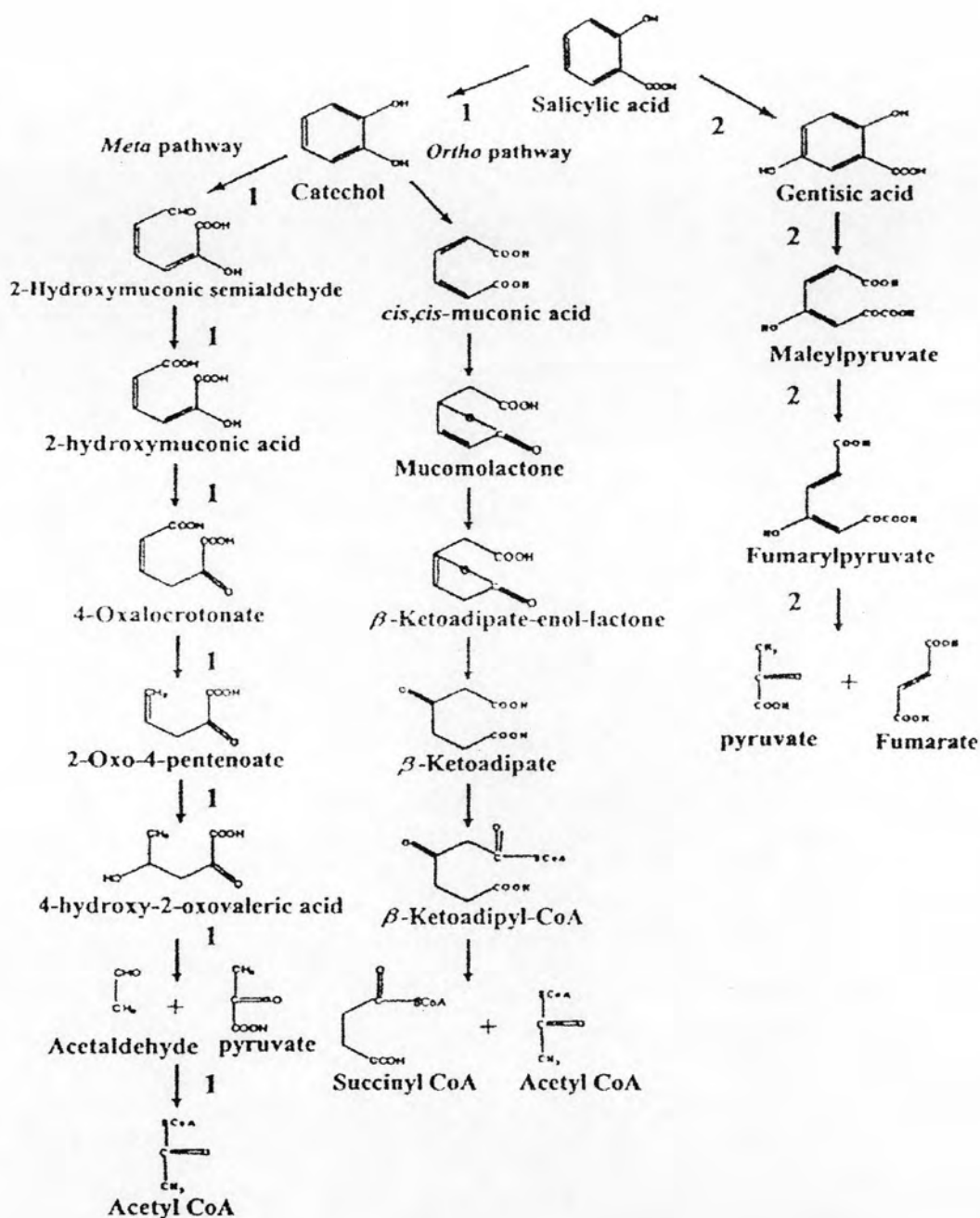
รูปที่ 2.3 การเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของแนพทาลีนไดออกซิจีเนสและยีนประมวลรหัสแนพทาลีนไดออกซิจีเนสใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Gibson และ Parales, 2000)

จากนั้นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนกรดซาลิไซลิกไปเป็นแคทีคอล โดยซาลิไซเลตไฮดรอกซิเลส (salicylate hydroxylase) โดยแคทีคอล จะย่อยสลายต่อโดยแตกวงเบนซีนแบบ ออโธ หรือ เมตา จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซัคซินิลโคเอ (succinyl Co A) หรืออะซิติลโคเอ (acetyl Co A) (Yen และ Gunsalus, 1982) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังมีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกที่ไม่ผ่านแคทีคอล แต่เปลี่ยนกรดซาลิไซลิกไปเป็นกรดเจนทิสิก (gentisic acid) เช่น *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 (Allen และคณะ, 1997) และ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) โดยกรดเจนทิสิกจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นมาเริลไพรูเวต (maleylpyruvate) ด้วยกิจกรรมของเจนทิเสต-1,2-ไดออกซิจีเนส (gentisate-1,2-dioxygenase) และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สามารถเข้าวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก ได้แก่ ไพรูเวต (pyruvate) และ ฟูมาเรต (fumarate) เรียกวิถีการย่อยสลายตั้งแต่กรดซาลิไซลิกจนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์ที่เข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกว่าวิถีการย่อยสลายส่วนล่าง (lower pathway) ดังแสดงในรูปที่ 2.5





รูปที่ 2.4 วิถีบนของการย่อยสลายแนพทาลีนโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982)



รูปที่ 2.5 วิธีต่างของการย่อยสลายเนฟทาลีนโดยจุลินทรีย์ต่างๆ 1) *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) 2) *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001)

## 2.2.2 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพทีน

อะซีแนพทีนเป็นสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างซับซ้อนกว่าแนพทาซีน โดยประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2 วงเชื่อมต่อกับวงไซโคลเพนเทน 1 วง รายงานที่เกี่ยวกับการย่อยสลายอะซีแนพทีนมีมาเป็นเวลานานแต่ยังไม่มีการศึกษาที่สมบูรณ์ทั้งในแบคทีเรียและรา โดยสามารถสรุปแบคทีเรียที่ย่อยสลายอะซีแนพทีนได้ดังตารางที่ 2.3 โดยส่วนใหญ่เป็นการย่อยสลายแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลให้เป็นสารมัธยันตรชนิดต่างๆ มีแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนได้

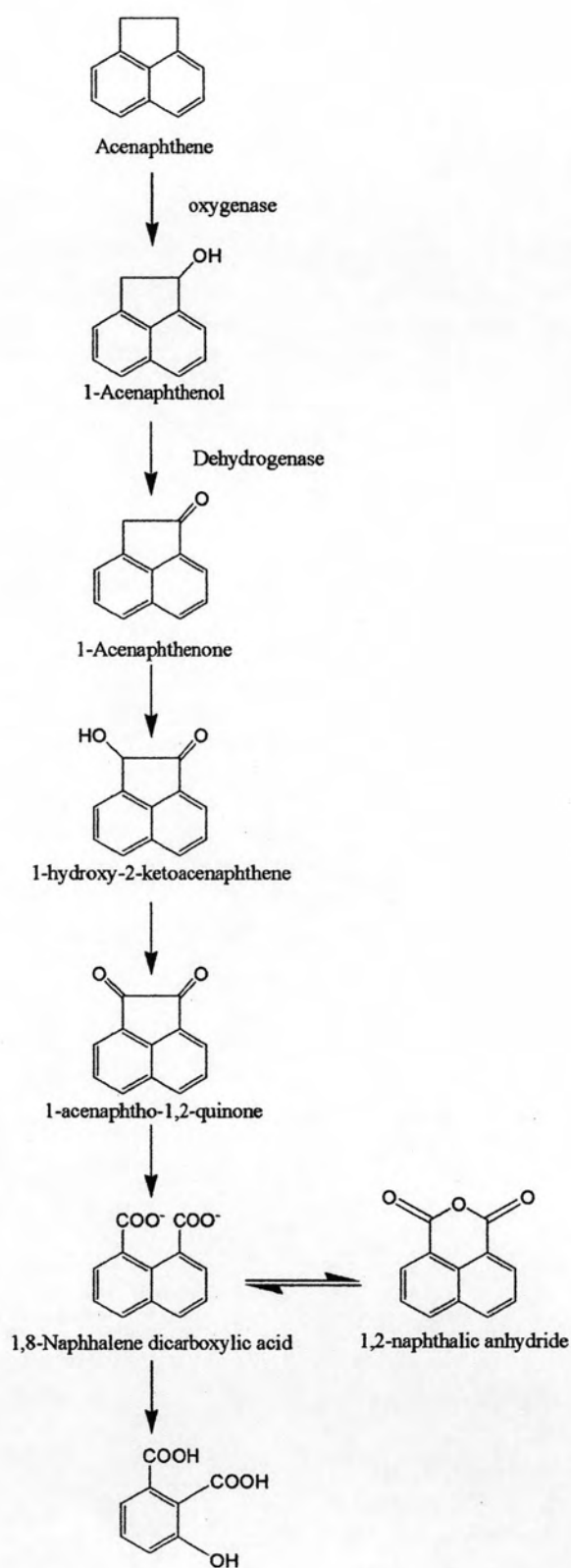
ตารางที่ 2.3 แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีน

แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Beijerinckia</i> sp. ( <i>Sphingobium yanoikuyae</i> strain B1)	Schocken และ Gibson (1984) (Khan และคณะ (1996))
<i>Beijerinckia</i> sp. B8/36 (mutant strain of <i>Beijerinckia</i> sp.)	Schocken และ Gibson (1984)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Selifonov และคณะ (1993)
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	Selifonov และคณะ (1993)
<i>Pseudomonas</i> sp. A4 ( <i>Sphingomonas</i> sp. A4)	Komatsu และคณะ (1993) (Pinyakong และคณะ (2004))
<i>Pseudomonas</i> sp. A2279	Selifonov และคณะ (1998)
<i>Sphingomonas</i> sp.	Hormisch และคณะ (2000)
<i>Sphingomonas aromaticivorans</i> strain B0695	Shi และคณะ (2001)
<i>Sphingomonas</i> sp. SP2	Saipheth และคณะ (2006)

Schocken และ Gibson (1984) พบว่า *Beijerinckia* sp. ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไบฟีนิลได้ สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีนร่วมกับอะซีแนพทีลีนแบบโคออกซิเดชันโดยมีไบฟีนิลเป็นตัวเหนี่ยวนำ พบว่าสามารถเปลี่ยนโครงสร้างอะซีแนพทีนเป็นอะซีแนพทีนอล (acenaphthenol) โดยอาศัยกิจกรรมของโมโนออกซิจีเนส และเกิดกระบวนการไฮโดรอกซีเลชันได้ ผลิตภัณฑ์เป็นอะซีแนพทีโนน (acenaphthenone) หลังจากนั้นจะถูกออกซิไดส์ด้วยดีไฮโดรจีเนส เป็น 1-ไฮโดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพทีน (1-hydroxy-2-ketoacenaphthene) และ 1,2-ไดไฮโดรอกซีอะซีแนพทีลีน (1,2-dihydroxyacenaphthylene) ซึ่งเป็นเทาโทเมอร์ และจะถูกออกซิไดส์หรือรีดิวซ์ด้วยดีไฮโดรจีเนสและรีดักเทส จนกลายเป็นอะซีแนพทีนควิโนน (acenaphthenequinone) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย แสดงว่า *Beijerinckia* sp. ไม่สามารถแตกวงไซโคลเพนเทนได้ (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Sphingomonas yanoikuyae* strain B1 (Khan และคณะ, 1996)

Komatsu และคณะ (1993) พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 สามารถใช้อะซีแนพทีนและอะซีแนพทีลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และมีการย่อยสลายอะซีแนพทีนโดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิลโดยกิจกรรมของออกซิจีเนสได้เป็น 1-อะซีแนพทีนอล และ 1-อะซีแนพทีโนน (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Pinyakong และคณะ, 2004)) และในปี 2003 พบว่าสายพันธุ์ A4 สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของ กรด 1,8-แนพทาลีนไดคาร์บอกซิลิกเป็น กรด 3-ไฮโดรอกซีพลาธาติก (Pinyakong, 2003c)

Selifonov และคณะ (1993) รายงานการย่อยสลายอะซีแนพทีนโดย *Alcaligenes eutrophus* และ *A. paradoxus* ที่สามารถใช้อะซีแนพทีน ซาลิไซเลท และเจนทิเสท เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่าอะซีแนพทีนถูกเติมออกซิเจน 1 อะตอมลงบนวงไซโคลเพนเทนได้ ผลิตภัณฑ์เป็นอะซีแนพทีนอล จากกิจกรรมของโมโนออกซิจีเนส หลังจากนั้นจะถูกออกซิไดส์ด้วยไดออกซิเดไฮโดรจีเนส ไปเป็น 1-ไฮโดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพทีน และอะซีแนพทีนไดออกซีซึ่งเป็นเทาโทเมอร์ และถูกออกซิไดส์หรือรีดิวซ์และแตกตัวได้เอง ทำให้วงไซโคลเพนเทนแตกออกจนได้เป็นกรด 1,8-แนพทาลีนไดคาร์บอกซิลิก และกรด 3-ไฮโดรอกซีเจนซีน-1,2-ไดคาร์บอกซิลิก ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีนโดย *Spingomonas* sp. A4 (Pinyakong, 2003c)



Selifonov และคณะ (1996) ศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพธินโดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 ที่มียีนแนพธาลีนไดออกซิจีเนสบนพลาสมิด NAH 7 พบว่าสามารถเปลี่ยนโครงสร้างอะซีแนพธินเป็นอะซีแนพธินอล และอะซีแนพธิโนน โดยการเติมออกซิเจน 1 อะตอมเข้าที่ตำแหน่งที่ 1 ของกลุ่มเมทิลเลนิก (methylenic group) โดยการเร่งปฏิกิริยาของไมโนออกซิจีเนส หลังจากนั้นเกิดการดีไฮโดรชันได้ ซิส- หรือ ทรานส-อะซีแนพธิน-1,2-ไดออล แต่ส่วนใหญ่มักเป็น ซิส-อะซีแนพธิน-1,2-ไดออล และถูกออกซิโดส์ด้วยดีไฮโดรจีเนส และรีดักเทสจนกลายเป็นอะซีแนพธินควิโนน และจะแตกตัวได้เองเป็นกรด 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งพบในรูปแบบแอนไฮไดรด์ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในปี 1998 มีการรายงานการติดตามการเปลี่ยนโครงสร้างของอะซีแนพธินโดยการติดตามด้วย  $^{13}\text{C}$  ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 พบการเปลี่ยนโครงสร้างของอะซีแนพธินเป็น เป็นอะซีแนพธินอล อะซีแนพธิโนน อะซีแนพธิน-1,2-ไดออล และ กรด 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ โดยอาศัยการแสดงออกของยีนแนพธาลีนไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไมโนออกซิเดสในขั้นแรก

Selifonov และคณะ (1998) รายงานการทดสอบการใช้อะซีแนพธินเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้เทคนิคการติดตามคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของอะซีแนพธินด้วย  $^{13}\text{C}$  พบว่า mixed culture (CREOMIX) แยกจากดินปนเปื้อนครีโอสไตรสามารถย่อยสลายอะซีแนพธินเป็น 1-อะซีแนพธินอล 1-อะซีแนพธิโนน อะซีแนพธิน-1,2-ไดออล และกรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก และเมื่อเติม *Pseudomonas* sp. A2279 ซึ่งสามารถใช้อะซีแนพธินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (Selifonov และ Chapman, 1996; ไม่ตีพิมพ์) พบว่า CREOMIX ที่เติมสายพันธุ์ A2279 มีการใช้อะซีแนพธินจนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

Hormisch และคณะ (2000) แยกแบคทีเรียจากบริเวณที่มีการทับถมของพืชและปนเปื้อนสาร PAHs พบ 2 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีอะซีแนพธินหรืออะซีแนพธิลีน แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีแนพธาลีน พีแนพทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนธิน ฟลูออรีน และไพรีน เมื่อเติมกรดซาลิซิลิกพบมีการยับยั้งการเจริญบนอาหารที่มีอะซีแนพธินหรืออะซีแนพธิลีน และพบสารมัธยันตร์ อะซีแนพธินอล อะซีแนพธิโนน และกรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิกเมื่อเจริญบนอาหารที่มีอะซีแนพธิน โดยทั้ง 2 สายพันธุ์จัดอยู่ในสายพันธุ์ *Sphingomonas* sp.

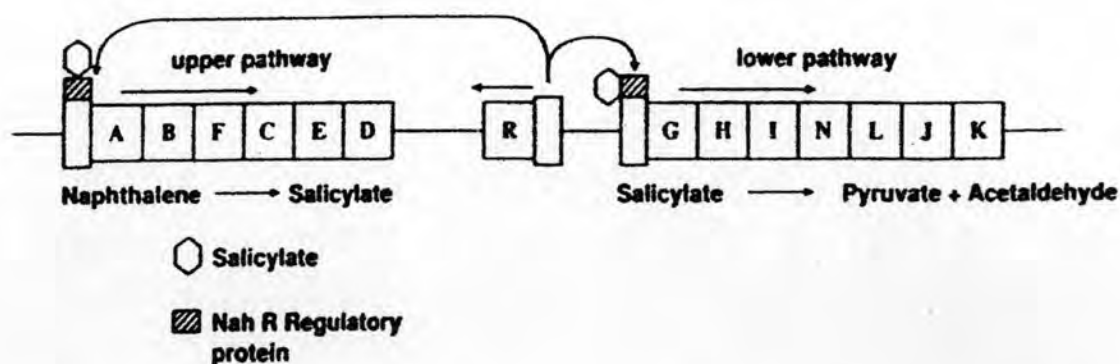
Saiphet และคณะ (2006) ได้คัดแยก *Sphingomonas* sp. SP2 จากน้ำเสียที่ปนเปื้อนด้วยผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมในประเทศไทย สายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยอะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน แต่ไม่สามารถเจริญโดยใช้ PAHs ชนิดอื่น ได้แก่ แนพทาลีน ฟีนานทรีน แอนทราซีน ไดเบนโซฟูแรน ฟลูออแรนทีน ฟลูออรีน และไพรีน ในการย่อยสลายอะซีแนพทีนและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบสารมัธยันตร์ 2 ชนิด มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.41 และ 0.63 ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานพบว่าสารมัธยันตร์ทั้ง 2 ชนิด คือ กรดซาลิกไซลิกและอะซีแนพทีนควิโนน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายอะซีแนพทีนโดยสายพันธุ์ SP2 เกิดขึ้นโดยผ่านอะซีแนพทีนควิโนนซึ่งถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นกรดซาลิกไซลิก และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานต่อไป

ปัจจุบันมีเพียง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ที่มีการนำมาศึกษาอย่างต่อเนื่องในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีน ซึ่งกล่าวรายละเอียดไว้ในเรื่องยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีนต่อไป

## 2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

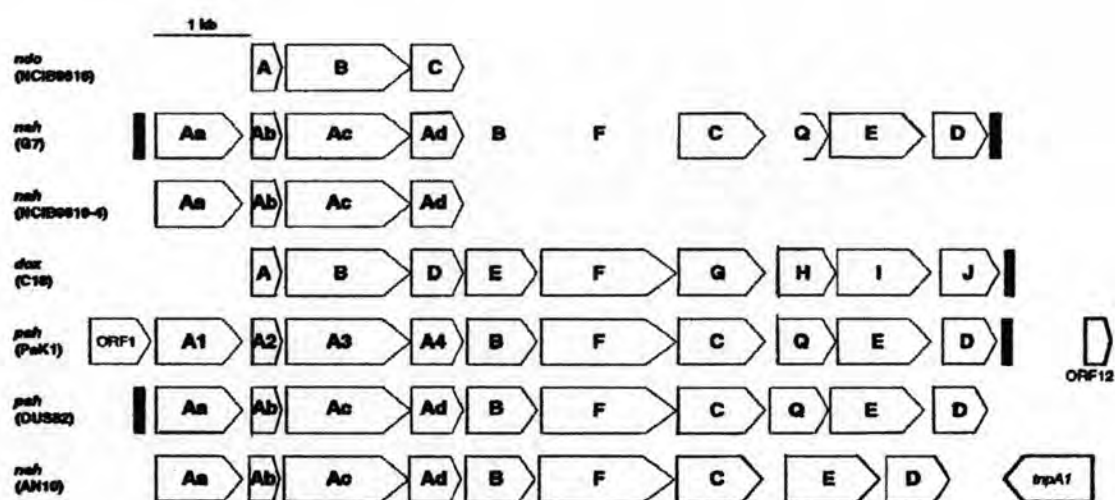
### 2.3.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ

ปัจจุบันมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียกลุ่ม pseudomonad เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จึงมีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียกลุ่มนี้อย่างสมบูรณ์ จากรายงานของ Yen และ Gunsalus (1982) พบพลาสมิด NAH7 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาลินของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 ที่มีการเรียงตัวของยีนเป็น 2 โอเปอรอน คือ โอเปอรอน *nah* ประกอบด้วย *nahABFCED* ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในส่วน upper pathway โดยทำหน้าที่ในการย่อยสลายเนฟธาลินไปเป็นซาลิไซเลต และโอเปอรอน *sal* ประกอบด้วย *nahGHINLJK* ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในส่วน lower pathway โดยทำหน้าที่ในการย่อยสลายซาลิไซเลตผ่านทางแคทีคอลและย่อยสลายจนกระทั่งได้เป็นไพรูเวตและอะซีตัลดีไฮด์ โดยมีระบบยีนควบคุม คือ *nahR* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างโอเปอรอน *nah* และ *sal* โดยมีการจัดเรียงตัวของยีนในทิศทางตรงกันข้าม ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของทั้ง 2 โอเปอรอน ซึ่งต้องการสารเหนี่ยวนำ ได้แก่ ซาลิไซเลตและโปรตีน NahR ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากยีนควบคุม *nahR* ดังแสดงในรูปที่ 2.7



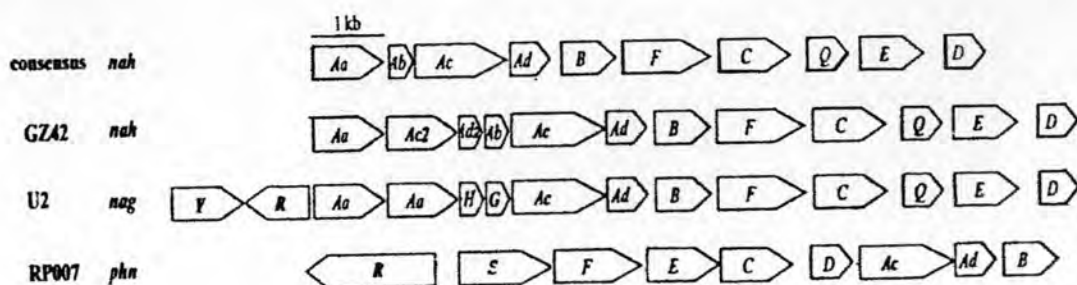
รูปที่ 2.7 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาลินและระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982)

*Pseudomonas* สายพันธุ์อื่นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แนพธาซีนและฟิแนนทรีน มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีการเรียงตัวคล้ายกันกับ *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มากกว่า 90% (Simon และคณะ, 1993) จึงเรียกยีนกลุ่มนี้ว่ายีนกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like) ตัวอย่างยีนในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษา ได้แก่ *ndo* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 (Kurkela และคณะ, 1988) *dox* ของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993) *pah* ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 (Takizawa และคณะ, 1999) *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994) *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993) และ *nah* ของ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999) เป็นต้น ตัวอย่างการจัดเรียงของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในวิถีบนของการย่อยสลายแนพธาซีน ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 การเรียงของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในวิถีบนของการย่อยสลายแนพธาซีนของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816, *P. putida* สายพันธุ์ G7, *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4, *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1, *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 และ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003) *nahA*: แนพธาซีนไดออกซิจีเนส *nahB*: แนพธาซีนไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส *nahC*: ไดไฮดรอกซีแนพธาซีนไดออกซิจีเนส *nahD*: HCCA ไอโซเมอเรส *nahE*: tHBPA ไฮดราเทส-แอลโคโรเลส *nahF*: ซาลิไซแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียชนิดอื่น ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับยีนที่มีการเรียงตัวแตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 กลุ่มยีนที่มีการเรียงตัวแตกต่างจากกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ *nah* ของ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ GZ42, *nag* ของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 และ *phn* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003)

Goyal และ Zylstra (1996) รายงานเกี่ยวกับ *nah* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรีนและเนฟธาลินใน *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสายพันธุ์ GZ42 มีความแตกต่างจาก *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 โดยไม่เกิดสัญญาณไฮบริดส์กับดีเอ็นเอติดตาม *nah* ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nah* บนพลาสมิด NAH7 และพบยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*nahAa*) เพอร์ริดอกซิน (*nahAb*) ISP หน่วยย่อยแอลฟา และหน่วยย่อยบีตา (*nahAcAd*) ฮิส-ไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส (*nahB*) และ แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*nahF*) แต่ระหว่าง *nahAa* และ *nahAb* มี *nahAc2* และ *nahAd2* ที่ประมวลรหัส ISP หน่วยย่อยแอลฟา และหน่วยย่อยบีตาแทรกอยู่ นอกจากนี้ยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรีนและเนฟธาลิน *phd* ของสายพันธุ์ GZ39 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มคล้าย *nah* และยีนที่พบในสายพันธุ์ GZ42



Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ศึกษาเกี่ยวกับเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนมทรีน และแนพธาลินใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 พบ *phnR* และ *phnS* ซึ่งประมวลรหัสโปรตีนควบคุม และพบยีนประมวลรหัสแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*phnF*) ไฮดรากลูต-แอลโดเลส (*phnE*) ไดออกซิจีเนส (*phnC*) ไอโซเมอเรส (*phnD*) ISP หน่วยย่อยแอลฟา และบีตา (*phnAcAd*) และไดไฮโดรไดออกซิดีไฮโดรจีเนส (*phnB*) ซึ่งมีการเรียงตัวเป็น *phnFECDAcAdB* ต่างจาก *nahAaAbAcAdBFCQED* ของสายพันธุ์ G7 และไม่พบยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินรีดักเทสและเพอร์ริดอกซิน แต่เมื่อโคลน *phnFECDAcAdB* ร่วมกับ *phnR* และ *phnS* เข้าใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  พบว่าสามารถย่อยสลายแนพธาลินจนได้กรดซาลิไซลิกได้ และพบว่า *phn* นี้มีการถอดรหัสร่วมกันเมื่อเลี้ยงในแนพธาลินและพีแนมทรีน

Zhou และคณะ (2001) รายงานว่า *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 ซึ่งสามารถย่อยสลายแนพธาลินได้ มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลินผ่านไประจุนกเทศ โดยพบยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*nagAa*) เพอร์ริดอกซิน (*nagAb*) ISP หน่วยย่อยแอลฟา และหน่วยย่อยบีตา (*nagAcAd*) ซิส-ไดไฮโดรไดออกซิดีไฮโดรจีเนส (*nagB*) และ แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*nagF*) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเหมือนกับ *nah* ในพลาสมิด NAH7 แต่ระหว่าง *nagAa* และ *nagAb* มี *nagGH* ซึ่งประมวลรหัสหน่วยย่อยของซาลิไซเลต 5-ไฮดรอกซิโลเอสแทรกอยู่ โดยมีการเรียงตัวของยีนดังนี้ *nagAaGHAbAcAdBFCQED* และพบ *nagJIKLMN* ซึ่งประมวลรหัสยีนที่ย่อยสลายเจนนิกเทศที่ตำแหน่ง downstream ของ *nagD* โดยเมื่อศึกษาโปรตีนที่ประมวลรหัสโดย *nagI nagL* และ *nagK* พบว่า *nagI* ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเจนนิกเทศเป็นมาเลิลไพรูเวต *nagL* ประมวลรหัสเป็นมาเลิลไพรูเวตไอโซเมอเรสทำหน้าที่เปลี่ยนมาเลิลไพรูเวตเป็นฟูมาริลไพรูเวต และ *nagK* ประมวลรหัสเป็นไฮโดรเลสทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ฟูมาริลไพรูเวตเป็นฟูมาเรตและไพรูเวต และคาดว่า *nag* น่าจะมีการถอดรหัสร่วมกันเป็นโอเปอรอนเดียวกัน

มีรายงานเกี่ยวกับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของ *Sphingomonas* sp. มีการจัดเรียงตัวอยู่ห่างกันเนื่องจากถูกค้นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลาย PAHs ต่างชนิดกัน และส่วนใหญ่ในหนึ่งสายพันธุ์มียีนในการย่อยสลาย PAHs หลายชุดเพื่อย่อยสลายสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน (Pinyakong และคณะ, 2003a) เช่น รายงานของ Romine และคณะ (1999) เกี่ยวกับ *Sphingomonas aromaticivorans* F199 (ภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็น *Novosphingomonas aromaticivorans* F199 (Takeuchi และคณะ, 2001) พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs บนพลาสมิดขนาด 184 กิโลเบส ซึ่งมียีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสทั้ง 6 ชุด ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกหลายชนิด ได้แก่ ไบฟีนิล แนพทาลีน เมตา-ไซลีน และ พารา-ครีซอล จากการระบุตำแหน่งของยีนต่างๆ พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีน ได้แก่ *nahE nahD* และ *nahF* มีการกระจายตัวอยู่ห่างกันและถูกค้นด้วยยีนในวิถีการย่อยสลายสารอื่น และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้ง 3 กับลำดับกรดอะมิโนที่ประมวลรหัสจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำ แต่เนื่องจากสายพันธุ์ F199 ไม่สามารถย่อยแนพทาลีนไปเป็นซาลิไซเลตได้ แสดงว่ายีนประมวลรหัสวิถีการย่อยสลายแนพทาลีนส่วนบนที่หายไป น่าจะมีการทดแทนโดยยีนประมวลรหัสเอนไซม์สำหรับวิถีการย่อยสลายสารอื่น เช่น วิถีการย่อยสลายไบฟีนิลที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้กับสารตั้งต้นอื่นๆ ที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ส่วนในวิถีล่างไม่พบ *nahG* ซึ่งจำเป็นต่อการย่อยสลายแนพทาลีนผ่านทางแคทีคอล แสดงว่าการย่อยสลายแนพทาลีนในวิถีล่างของสายพันธุ์ F199 ไม่ผ่านทางแคทีคอล หรืออาจมีเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแคทีคอล และในปี 2003(b) Pinyakong และคณะ พบยีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสทั้ง 5 ชุด (*ahdA1[a-e]* และ *ahdA2[a-e]*) ของ *Sphingomobium* sp. สายพันธุ์ P2 และพบยีนเฟอร์ริดอกซิน (*ahdA3*) และเฟอร์ริดอกซินรีดักเทส (*ahdA4*) เพียงชุดเดียว จากการศึกษาหน้าที่ของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส 3 ชุด (*ahdA1[c-e]* และ *ahdA2[c-e]*) ซึ่งแสดงออกใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 พบ 3 เอนไซม์ (AhdA2cA1c, AhdA1dA2d และ AhdA1A2e) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซาลิไซเลตซึ่งเป็นสารมัธยันตรในวิถีการย่อยสลายพีแนนทรีนให้เป็นแคทีคอล เรียกว่าเอนไซม์ซาลิไซเลต 1-ไฮดรอกซิเลส (salicylate 1-hydroxylase) ซึ่งทั้ง 3 เอนไซม์ทำงานร่วมกับเฟอร์ริดอกซินและเฟอร์ริดอกซินรีดักเทส (AhdA3A4) ชุดเดียวกัน

Demaneche และคณะ (2004) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และศึกษาหน้าที่ของยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ CHY-1 โดยการแยกโปรตีนจากสายพันธุ์ CHY-1 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโครซีนและแนพทาลีนเป็นแหล่งคาร์บอน พบโปรตีน 2 ชนิดที่มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายหน่วยย่อยบีตาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส และเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนสของ *Novosphingobium aromaticivorans* F199 เพื่อออกแบบตัวติดตามเพื่อคัดเลือกโคลนจากห้องสมุดดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CHY-1 พบว่าโคลนแรกบรรจุ 3 ยีน คือ ยีนประมวลรหัสเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส (*phnA1<sub>a</sub>*, *phnA2<sub>a</sub>*; โปรตีน PhnI) และเอริลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (*phnB*) โคลนที่ 2 พบ 6 ยีนประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกไซด์ออกซิจีเนส (*phnC*), เฟอริดอกซิน (*phnA3*), รีดักเทส (*phnA4*), ออกซิจีเนส (*phnA1<sub>b</sub>*, *phnA2<sub>b</sub>*; โปรตีน PhnII) และไอโซเมอเรส (*phnD*) จากการตรวจสอบการทำงานของ PhnI และ PhnII ใน *E. coli* พบว่า PhnI สามารถย่อยสลายโครซีนและสารในกลุ่ม PAHs ที่มีวงเบนซินมากกว่า 2 วง ส่วน PhnII สามารถย่อยสลายซาลิไซเลต และอนุพันธ์ของซาลิไซเลต นอกจากนี้ได้กลายพันธุ์ *Sphingomonas* sp. CHY-1 ให้ไม่สามารถผลิต PhnI พบว่าสายพันธุ์กลายดังกล่าวไม่สามารถย่อยโครซีนและสาร PAHs แสดงว่ายีนประมวลรหัส PhnI สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครซีนและสาร PAHs ของสายพันธุ์ CHY-1 และในปี 2007 Jakovic และคณะ ทำนายโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน PhnI จากสายพันธุ์ CHY-1 เพื่อศึกษาบริเวณที่เข้าจับกับสารตั้งต้น

การศึกษาหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 แสดงรายละเอียดไว้ในเรื่องหน้าที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีนต่อไป

### 2.3.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก

Saito และคณะ (2000) รายงานว่า *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 มี *phd* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนทรีนผ่านทางพธาลเอท (phthalate) โดย *phd* ประกอบด้วยยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *phdEFABGHCD* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพีแนทรีนไปเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธานีโอเอท (1-hydroxy-2-naphthoate) และ *phdIJK* ประมวลรหัสยีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธานีโอเอท ไปเป็นพธาลเอท

Khan และคณะ (2001) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนทรีน แอนทราซีน เบนโซ(เอ)ไพรีน และพบ *nid* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงของยีนที่แตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในกลุ่มคล้าย *nah* โดยมีการเรียงตัวเป็น *nidDBA* ซึ่งยีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์นี้มีเพียง *nidBA* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสในสภาวะ ISP หน่วยย่อยแอลฟาและบีตา ตามลำดับ แต่ขาดยีนส่วนที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบว่า *nidBA* มีความแตกต่างจาก *nah*-like มากกว่า 60% และในปี 2007 Kim และคณะ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในจีโนมของสายพันธุ์ PYR-1 เพื่อวิเคราะห์ยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนจนได้เข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก

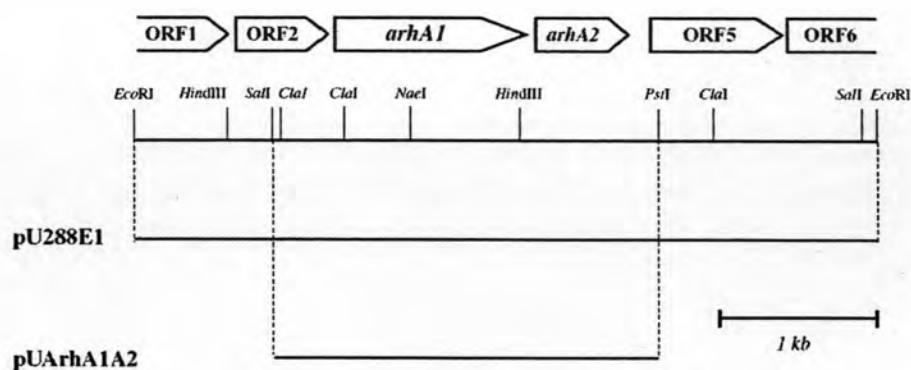
นอกจากนี้ Larkin และคณะ (1999) และ Kulakov และคณะ (2005) ยังได้รายงานถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนของแบคทีเรียแกรมบวกพบว่า *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนทางด้านเมตา กระจายอยู่บนพลาสมิด p2SL1 โดยพบ *narAa narAb* และ *narB* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนส และ ซิต-แนพธาลีนไดไฮโดรไดออกซิไดไฮโดรจีเนส ตามลำดับ พบว่ายีนทั้งสามมีการถอดรหัสร่วมกันเพื่อตอบสนองต่อแนพธาลีนเท่านั้น โดยเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *narAa* และ *narAb* กับฐานข้อมูล EMBL และ GenBank พบว่า *narAa* และ *narAb* มีความเหมือนกับยีนประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (ring-hydroxylating dioxygenase) ของ *Pseudomonas* sp. เพียง 31% และ 39% ตามลำดับ และไม่พบยีนประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบ *narR1* และ *narR2* ประมวลรหัสโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของยีนกลุ่มนี้ด้วย



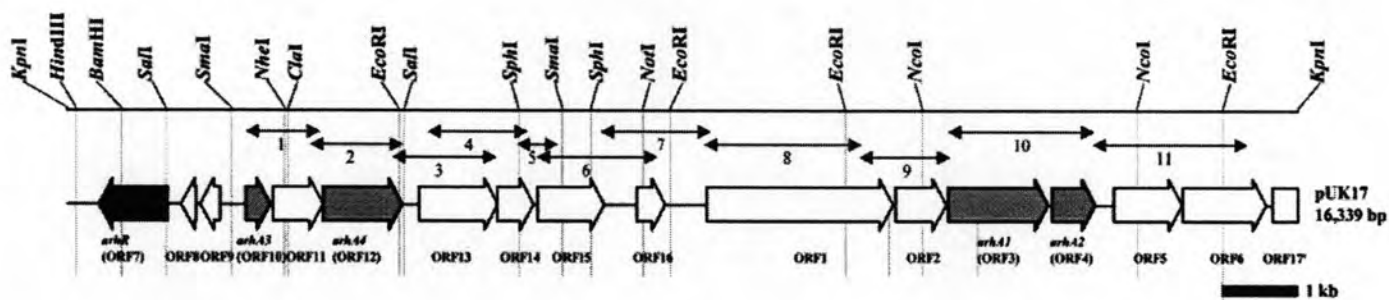
### 2.3.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทริน

ในปัจจุบันรายงานที่เกี่ยวข้องกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทรินมีน้อยมาก มีเพียงรายงานของ Pinyakong และคณะ (2004) ที่สร้างห้องสมุดดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทรินและอะซีแนพทรินเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานงานได้ แต่ไม่สามารถใช้ PAHs ชนิดอื่นในการเจริญ มีรายงานการแยกและศึกษาหน้าที่ของยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทรินเป็นครั้งแรกในสายพันธุ์ A4 โดยพบชิ้นดีเอ็นเอที่บรรจุ 6 Open Reading Frames (ORFs) ดังแสดงในรูปที่ 2.10 ยีน *arhA1* และ *arhA2* ทำหน้าที่ประมวลผลหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของไดออกซิจีเนส ตามลำดับ มีลำดับกรดอะมิโนเหมือน 56% และ 45% กับโปรตีน PhnAc และ PhnAd ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนพทรินของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 และเมื่อจัดกลุ่มลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อยแอลฟาพบว่า *ArhA1* มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากหน่วยย่อยแอลฟาของ *Sphingomonas* sp. ที่กล่าวข้างต้น เนื่องจากความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่แตกต่างกันทำให้พบเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่แตกต่างกัน และจาก 6 ORFs ไม่พบยีนเพอร์ริดอกซินและเพอร์ริดอกซินรีดักเทส แสดงว่ายีนทั้ง 2 อาจอยู่ในบริเวณอื่น จึงมีการใช้พลาสมิด pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนเพอร์ริดอกซิน (*ahdA3*) และเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*ahdA4*) ของ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์ P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b) ในการตรวจสอบหน้าที่ของไดออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ A4 ใน *E.coli* พบว่าสามารถย่อยสลายอะซีแนพทริน อะซีแนพทริน แนพธาซีน พีแนพทริน แอนทราซีน และฟลูออแรนธิน แต่ไม่ย่อยสลายไพรีน และในปี 2006 Kouzuma และคณะ พบยีนเพอร์ริดอกซิน (*arhA3*) ยีนเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*arhA4*) และยีนควบคุม (*arhR*) ของวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทรินในสายพันธุ์ A4 อยู่ห่างไปทาง upstream ของยีนประมวลผลอะซีแนพทริน ไดออกซิจีเนส และมีการศึกษาการแสดงออกของยีนเมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยอะซีแนพทรินโดยเทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 พบว่าเมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยอะซีแนพทรินเกิดการแสดงออกในโอเปอรอนเดียวกันตั้งแต่บริเวณยีน *arhA3* ถึง *orf6* และเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *arhA3*, *arhA1* และ *arhR* ในเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Real-Time PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน *arhA3* และ *arhA1* มากขึ้นเมื่อเหนี่ยวนำด้วยอะซีแนพทรินและไม่พบการแสดงออกของยีนทั้ง 2 เมื่อทำการกลายพันธุ์สายพันธุ์ A4 ให้ไม่สามารถประมวลผล *arhR* ได้ (A4DR) และพบว่ามีการแสดงออกของ *arhR* เมื่อเหนี่ยวนำและไม่เหนี่ยวนำด้วยอะซีแนพทริน พบว่า *arhR* จัดเป็นยีนที่แสดงออกตลอดเวลา





รูปที่ 2.10 แสดงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะและบริเวณ ORFs บนดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *EcoRI* ขนาด 5 กิโลเบส (pU288E1) และบริเวณของดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *SalI* และ *PstI* ขนาด 2.6 กิโลเบส (pUArhA1A2) บรรจุยีน *arhA1* และ *arhA2* จาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Pinyakong และคณะ, 2004)



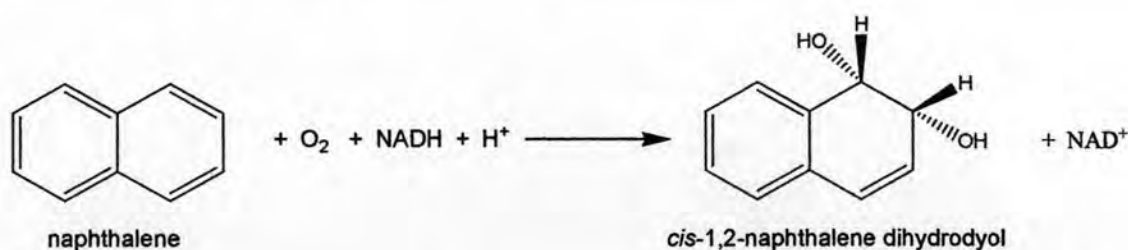
รูปที่ 2.11 แสดงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะและบริเวณ ORFs บนดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *KpnI* ขนาด 16.4 กิโลเบส และลูกศร 2 ทางแสดงบริเวณที่ศึกษาด้วยเทคนิค RT-PCR ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ, 2006)

## 2.4 ออกซิจีเนส (Oxygenase)

ออกซิจีเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนแก่สารประกอบอินทรีย์ มีหลายชนิด ซึ่งแตกต่างกันทางโครงสร้าง กลไกการทำงาน และความต้องการโคเอนไซม์ (coenzyme) ในการเร่งปฏิกิริยา โดยสามารถจำแนกออกซิจีเนสได้ 2 กลุ่ม ตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยา คือ ไมโนออกซิจีเนสและไดออกซิจีเนส ซึ่งเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนหนึ่งและสองอะตอมเข้ายังโมเลกุลของสารตั้งต้น ตามลำดับ แต่การจำแนกกลุ่มของออกซิจีเนสเป็นไมโนออกซิจีเนสหรือไดออกซิจีเนส โดยใช้ความแตกต่างของลักษณะการเร่งปฏิกิริยานั้นยังไม่ชัดเจน (Mason และ Cammack, 1992; Butler และ Mason, 1997) เนื่องจากมีรายงานกล่าวว่าโพลีอินไดออกซิจีเนสและแนพธาลีนไดออกซิจีเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาไมโนออกซิจีเนสได้ โดยสามารถออกซิไดส์อินดีน (indene) และอินแดน (indan) ไปเป็น 1-อินดานอล (1-indanol) (Wackett และคณะ, 1988)

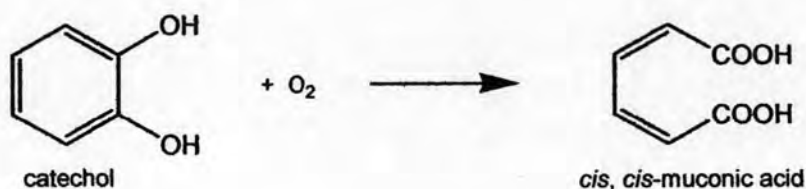
ไดออกซิจีเนสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกในหลายขั้นตอน โดยสามารถจำแนกไดออกซิจีเนสตามลักษณะของการเร่งปฏิกิริยา ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน เอนไซม์นี้ต้องการโคแฟกเตอร์ (co-factor) เช่น NAD(P)H ในปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนยังวงอะโรมาติก ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส-ไดออล ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น แนพธาลีนไดออกซิจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันโดยแนพธาลีนไดออกซิจีเนส

2. ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติก เอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ ในปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติก ของสารอนุพันธ์ไฮดรอกซิล (ได- หรือ ไตร-) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น แคทีคอล-1,2-ไดออกซิจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 2.13

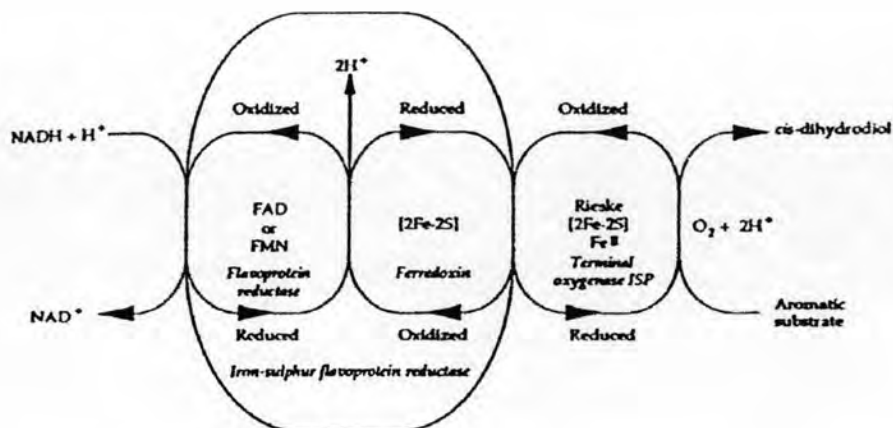


รูปที่ 2.13 การเร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติกโดยแคทีคอล-1,2-ไดออกซิจีเนส

#### 2.4.1 โครงสร้างของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส

รายงานแรกในการศึกษาระบบการทำงานของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส กล่าวถึงไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas putida* ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิไดส์เบนซีนไปเป็น ซิส-1,2-ไดไฮดรอกซีไซโคลเฮกซะ-3,5-ไดอีน (*cis*-1,2-dihydroxy-cyclohexa-3,5-diene) จึงเริ่มมีการศึกษาไดออกซิจีเนสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ อย่างกว้างขวาง ไดออกซิจีเนสจัดเป็น non-heme iron dioxygenase ซึ่งสามารถออกซิไดส์สารประกอบอะโรมาติกได้เป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล หรือ กรดซิส-ไดออลคาร์บอกซิลิก

ริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนสทุกชนิดมีระบบการทำงานของเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโปรตีน 2-3 ชนิด ที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งอิเล็กตรอน คือ iron-sulfur flavoprotein หรือ flavoprotein และ iron-sulfur ferredoxin ซึ่งจะส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังเทอร์มินัลออกซิจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 การจัดเรียงของระบบการทำงานร่วมกันของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (Butler และ Mason, 1997)

Batie และคณะ (1992) ได้จำแนกไดออกซิจีเนสออกเป็น 3 กลุ่ม ตามความแตกต่างของจำนวนและขนาดของหน่วยย่อย ในส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนสและรีดักเทส คือ

1. Class I เป็นไดออกซิจีเนสที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ เทอร์มินัลออกซิจีเนส และรีดักเทส โดย Class I สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) ในส่วนรีดักเทส ได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ Class IA และ Class IB ซึ่งมี FAD และ FMN ตามลำดับ
2. Class II เป็นไดออกซิจีเนสที่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ เทอร์มินัลออกซิจีเนส รีดักเทส และเฟอร์รีดอกซิน โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามประเภท  $[2Fe-2S]$  cluster ของเฟอร์รีดอกซิน คือ Class IIA และ Class IIB ซึ่งมี  $[2Fe-2S]$  cluster เป็น plant-type iron sulfur และ Rieske-type iron sulfur ตามลำดับ
3. Class III เป็นไดออกซิจีเนสที่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ เทอร์มินัลออกซิจีเนส รีดักเทส และเฟอร์รีดอกซิน โดยทุกส่วนมี  $[2Fe-2S]$  cluster ชนิด Rieske-type iron sulfur เป็นองค์ประกอบ

สามารถสรุปรายละเอียดรายละเอียดย่อยต่างๆ ของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน ทั้ง 3 class ได้ดังแสดงในตารางที่ 2.4 (Nam และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.4 แสดงรายละเอียดต่างๆของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันในแต่  
ละกลุ่ม (Nam และคณะ, 2001)

Class	Components and Prosthetic Group(s)			Enzyme System
IA	<b>Reductase</b> FMN Cys <sub>4</sub> [2Fe-2S]		<b>Oxygenase</b> Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S] Fe <sup>2+</sup>	Phthalate dioxygenase ( <i>Burkholderia cepacia</i> DB01) Phenoxybenzoate dioxygenase ( <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> POB310) 3-Chlorobenzoate 3,4-dioxygenase ( <i>Alcaligenes</i> sp. strain BR60)
IB	<b>Reductase</b> FAD Cys <sub>4</sub> [2Fe-2S]		<b>Oxygenase</b> Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S] Fe <sup>2+</sup>	Benzoate 1,2-dioxygenase ( <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1) Toluene 1,2-dioxygenase ( <i>Pseudomonas putida</i> ) Anthranilate dioxygenase ( <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1) 2-Oxo-1,2-dihydroquinoline 8-monooxygenase ( <i>Pseudomonas putida</i> 86)
IIA	<b>Reductase</b> FAD	<b>Ferredoxin</b> Cys <sub>4</sub> [2Fe-2S]	<b>Oxygenase</b> Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S] Fe <sup>2+</sup>	Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase (Dioxin dioxygenase) ( <i>Sphingomonas</i> sp. RW1) Pyrazon dioxygenase ( <i>Pseudomonas</i> sp.)
IIB	<b>Reductase</b> FAD	<b>Ferredoxin</b> Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S]	<b>Oxygenase</b> Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S] Fe <sup>2+</sup>	Carbazole dioxygenase ( <i>Sphingomonas</i> sp. CB3) Toluene dioxygenase ( <i>Pseudomonas putida</i> F1) Benzene 1,2-dioxygenase ( <i>Pseudomonas putida</i> ML2 NCIB 12190) Biphenyl 2,3-dioxygenase ( <i>Pseudomonas</i> sp. LB400) Biphenyl dioxygenase ( <i>Pseudomonas</i> sp. strain KKS102) Chlorobenzene dioxygenase ( <i>Pseudomonas</i> sp. strain P51)
III	<b>Reductase</b> FAD Cys <sub>4</sub> [2Fe-2S]	<b>Ferredoxin</b> Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S]	<b>Oxygenase</b> Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S] Fe <sup>2+</sup>	Carbazole 1,9a-dioxygenase ( <i>Pseudomonas</i> sp. CA10) Naphthalene dioxygenase ( <i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816) Naphthalene dioxygenase ( <i>Pseudomonas putida</i> G7) Dibenzothiophene and naphthalene dioxygenase ( <i>Pseudomonas</i> sp. strain C18) Polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase ( <i>Burkholderia</i> sp. strain RP007) Polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase ( <i>Pseudomonas putida</i> OUS82) 2-Nitrotoluene dioxygenase ( <i>Pseudomonas</i> sp. strain JS42)



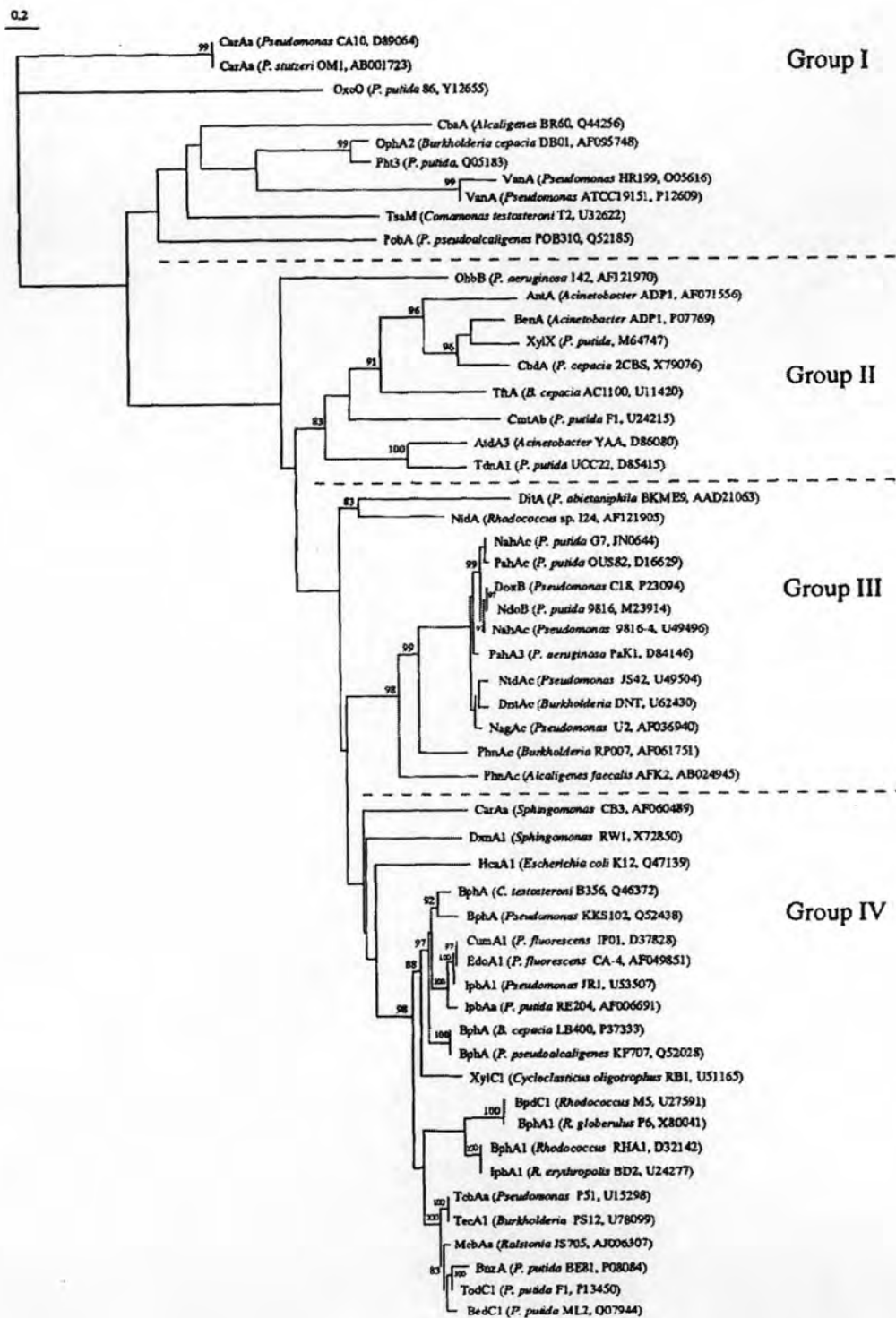
ในปี 2001 Nam และคณะ ได้จำแนกกลุ่มไดออกซิจีเนสโดยใช้ข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของหน่วยแอลฟา และชนิดของสารตั้งต้น โดยจำแนกได้ 4 กลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.15 คือ

Group I เป็นเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่มีความหลากหลาย และสามารถใส่สารตั้งต้นได้หลากหลาย โดยมีโครงสร้างเป็น (หน่วยย่อยแอลฟา)<sub>n</sub> ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งโมโนออกซิจีเนสและไดออกซิจีเนส

Group II เป็นเอนไซม์เบนโซเอต/โทลูเอตไดออกซิจีเนส เป็นเอนไซม์ที่ใช้ออกซิไดส์อะโรมาติกแอซิด (oxidize aromatic acids) เป็นสารตั้งต้น ไดออกซิจีเนสทั้ง 3 กลุ่มมีโครงสร้างเป็นเฮเทอโรมัลติเมอร์ (heteromultimer) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยแอลฟาและบีตา

Group III เป็นเอนไซม์แนพธาลีนไดออกซิจีเนส เป็นไดออกซิจีเนสจากแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการย่อยสลายแนพธาลีน พีแนนทรีน ไนโตรเบนซีน และไนโตรโทลูอีน รวมถึง PAH dioxygenase ด้วย

Group IV คือ โทลูอีนและไบฟีนิลไดออกซิจีเนส เป็นไดออกซิจีเนสจากแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกที่ใช้ในการย่อยสลาย โทลูอีน เบนซีน ไอโซโพรพิลเบนซีน คลอโรเบนซีน และไบฟีนิล



รูปที่ 2.15 phylogenetic tree ของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของริงไฮดรอกซิลเลทิงไดออกซิจีเนส, OxoO ของ *P. putida* สายพันธุ์ 86 (Y12655) เป็น outgroup, scale bar: 0.2 substitution per site และตัวเลขที่สาขานอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap (Nam และคณะ, 2001)

## 2.4.2 ระบบขนส่งอิเล็กตรอน (Electron transport system)

### 1 รีดักเทส (reductase component)

รีดักเทสเป็นเอนไซม์หน่วยแรกที่ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยจะรับอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ไปส่งให้รีดอกซ์เซ็นเตอร์ที่อยู่ถัดไป โดยส่วนรีดักเทสนี้สามารถรับอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ได้ครั้งละ 2 อิเล็กตรอน แต่สามารถส่งอิเล็กตรอนให้กับรีดอกซ์เซ็นเตอร์ถัดไปได้เพียง 1 อิเล็กตรอนเท่านั้น

### 2 เฟอริรีดอกซิน (ferredoxin component)

เฟอริรีดอกซินทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากส่วนรีดักเทส และส่งอิเล็กตรอนต่อไปยังเทอร์มินัลออกซิจีเนส โดยส่วนเฟอริรีดอกซินพบเฉพาะในไดออกซิจีเนสที่อยู่ใน class II และ Class III เท่านั้น

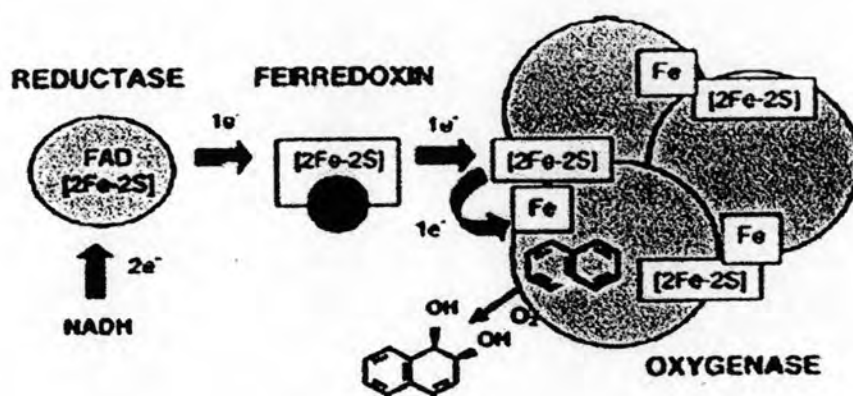
### 3 เทอร์มินัลออกซิจีเนส (terminal oxygenase)

เทอร์มินัลออกซิจีเนสประกอบด้วย [2Fe-2S] cluster และ mononuclear non-heme iron ( $Fe^{2+}$ ) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สารตั้งต้นมาจับและเกิดปฏิกิริยาโดย Class I A ในส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนส จะพบเฉพาะหน่วยย่อยแอลฟา ในขณะที่ Class I B ประกอบด้วยหน่วยย่อยแอลฟาและบีตา ที่มีโครงสร้างเป็น  $\alpha_3\beta_3$  ส่วน Class II และ Class III มีทั้งหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาที่มีโครงสร้างเป็น  $\alpha_2\beta_2$  และ  $\alpha_3\beta_3$  โดยในส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนสจะมีหนึ่ง [2Fe-2S] cluster ต่อ  $\alpha\beta$  dimer หรือ  $\alpha$  monomer

การขนส่งอิเล็กตรอนในส่วนประกอบต่างๆของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนสเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของ Fe ใน [2Fe-2S] cluster ซึ่งทำหน้าที่รับและส่งอิเล็กตรอนไปยังรีดอกซ์เซ็นเตอร์ที่อยู่ถัดไป โดยสามารถจำแนก [2Fe-2S] cluster ตามลักษณะกายภาพได้เป็น 2 กลุ่ม คือ plant-type [2Fe-2S] cluster และ Rieske-type [2Fe-2S] cluster (Butler และ Mason, 1997)

### 2.4.3 แนนพธาไลน์ไดออกซิจีเนส

แนนนพธาไลน์ไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ NCIB9816-4 เป็นเอนไซม์ที่ใช้เป็นต้นแบบของเอนไซม์ในกลุ่ม Rieske non-heme iron oxygenase เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษาแง่มุมต่างๆ อย่างกว้างขวาง การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันของแนนนพธาไลน์ไดออกซิจีเนส เริ่มจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H ไปยังรีดักเทส ที่ประกอบด้วย FAD และ [2Fe-2S] cluster และส่งไปยัง [2Fe-2S] cluster ของเฟอริดอกซิน จากนั้นอิเล็กตรอนจะส่งต่อไปยังเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสที่ประกอบด้วย 3[2Fe-2S] และ  $3\text{Fe}^{2+}$  ซึ่งเป็นส่วนที่เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังวงเบนซีนของแนนนพธาไลน์ ดังแสดงในรูปที่ 2.16 (Parales, 2003) โดยเทอร์มินัลของแนนนพธาไลน์ไดออกซิจีเนสมีโครงสร้างเป็น  $\alpha_3\beta_3$  ดังแสดงในรูปที่ 2.17 (Kauppi และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.16 การเร่งปฏิกิริยาและโครงสร้างของระบบการทำงานของแนนนพธาไลน์ไดออกซิจีเนส (Parales, 2003)



รูปที่ 2.17 โครงสร้างส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนสของแแนพธาซีนไดออกซิจีเนส (MMDB Id: 9837) domain สีชมพู (NDO A), น้ำตาล (NDO C) และเทา (NDO E) แทนหน่วยย่อยแอลฟา และ domain สีน้ำเงิน (NDO B), เขียว (NDO D) และเหลือง (NDO F) แทนหน่วยย่อยบีตา (Kauppi และคณะ, 1998)

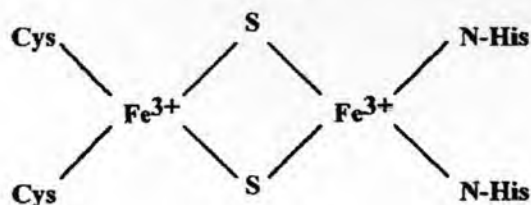
การศึกษาหน้าที่การทำงานของหน่วยย่อยแอลฟาและบีตา พบว่ากรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของหน่วยย่อยแอลฟาในแแนพธาซีนไดออกซิจีเนส ทำหน้าที่ควบคุมความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นโดยหน่วยย่อยแต่ละหน่วยประกอบด้วย 2 domain คือ

1. Rieske domain ซึ่งมี  $[2Fe-2S]$  โดย  $Fe^{3+}$  อะตอมแรกจะเกิดพันธะซัลไฟด์กับกรดอะมิโน Cys-81 และ Cys-101 ในขณะที่  $Fe^{3+}$  อีกอะตอมจะเกิดพันธะซัลไฟด์กับกรดอะมิโน His-83 และ His-104

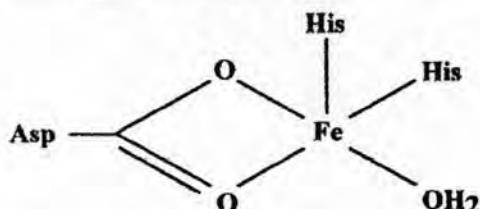
2. catalytic domain ซึ่งมี  $Fe^{2+}$  ที่บริเวณเร่ง จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน His-208 His-213 Asp-362 และโมเลกุลของน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.18

		81 83			101 104					
ก)	9816-4 NahAc	FLNV	C	R	H	RGKTLVSVEAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGELQS
	DNT DntAc	FLNV	C	R	H	RGKTIIVDAEAGNAKGFV	C	GY	H	GWGYGSNGELQS
	JS42 NtdAc	FLNV	C	R	H	RGKTLVHTEAGNAKGFV	C	GY	H	GWGYGSNGELQS
	LB400 BphA	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDIAGKLVN
	KF707 BphA1	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDIAGKLVN
	KKS102 BphA1	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	TY	H	GWAYDIAGNLVN
	PpF1 TodC1	FLNQ	C	R	H	RGMRICRADAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDTAGNLVN
	P51 TcbAa	FLNQ	C	R	H	RGMRICRSDAGNAKAFT	C	SY	H	GWAYDTAGNLVN

**Consensus sequence CxH-x15-17-CxxH**



		208		213		362			
ข)	9816-4 NahAc	ENFVGDAY	H	VGWT.	H	ASSLRSG	RTFGPAGFWESD	D	NDNMETAS
	DNT DntAc	ENFVGDIY	H	IGWT.	H	ASILRAG	RSTGPAGYWESD	D	NDNM.VLS
	JS42 NtdAc	ENFVGDIY	H	VGWT.	H	AAALRAG	RSIGPAGFWESD	D	NDNMETLS
	KKS102 BphA1	EQFCSDMY	H	AGTMS	H	LSGVLSS	FTFNQGGTYEQD	D	GENWVEVQ
	KF707 BphA1	EQFCSDMY	H	AGTMS	H	LSGILAG	RTFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ
	LB400 BphA	EQFCSDMY	H	AGTTT	H	LSGILAG	RNFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ
	F1 TodC1	EQFCSDMY	H	AGTTS	H	LSGILAG	RSFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ
	P51 TcbAa	EQFCSDAY	H	AGTTS	H	LSGILAG	RNFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ

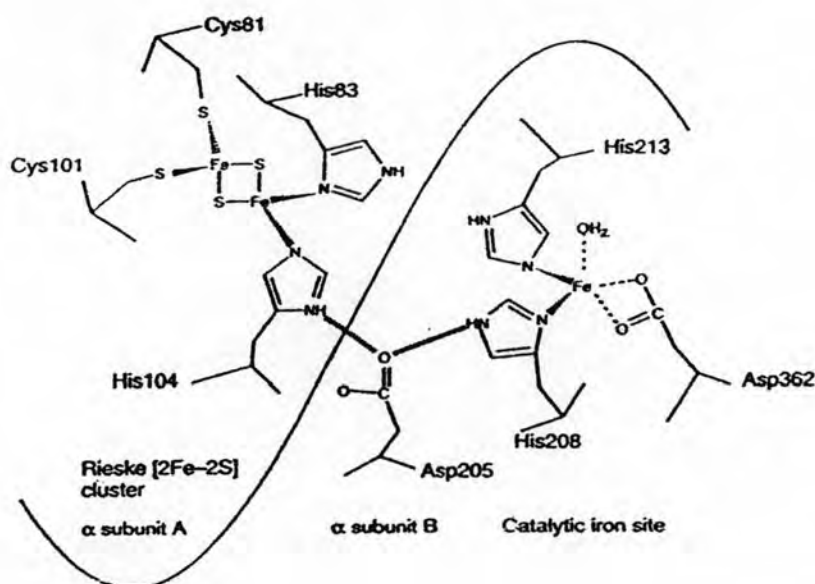


รูปที่ 2.18 การเปรียบเทียบความเหมือนของยีนและบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe<sup>2+</sup> ใน Rieske center ของหน่วยย่อยแอลฟา ก) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ [2Fe-2S] ข) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe<sup>2+</sup> ที่บริเวณเร่งเกิดเป็นสาร 2-His-carboxylate

9826-4: NahAc ของแบคทีเรียไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4, DNT: DntAc ของ 2,4-ไดไนโตรโทลูอีนไดออกซิจีเนสจาก *Burkholderia* sp. DNT, JS42: NtdAc ของ 2-ไนโตรโทลูอีนไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. JS42, KKS102: BphA1 ของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. KKS102, KF707: BphA1 ของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. KF707, LB400: BphA ของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก *Burkholderia* sp. LB400, F1: TodC1 ของโทลูอีนไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. F1, P51: TcbAa ของไตรคลอโรเบนซีนไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. P51



Kauppi และคณะ (1998) ศึกษาโครงสร้างผลึกแนพธาซีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp สายพันธุ์ NCIB9816-4 ในส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนส พบว่าโครงสร้างเป็น  $\alpha_3\beta_3$  โดยหน่วยย่อยแอลฟาจะจับกับหน่วยย่อยบีตาด้วยพันธะไฮโดรเจน และบริเวณเร่งการเกิดปฏิกิริยาประกอบด้วย [2Fe-2S] cluster และ  $Fe^{2+}$  ของหน่วยย่อยแอลฟาคนละหน่วยที่อยู่ใกล้กัน โดยมีกรดอะมิโน Asp-205 ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ His-104 ที่จับกับ [2Fe-2S] cluster ของหน่วยย่อยแอลฟาหนึ่ง และ His-208 ที่จับ  $Fe^{2+}$  ของหน่วยย่อยแอลฟาที่อยู่ใกล้เคียงทำหน้าที่สำคัญในการส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างหน่วยย่อยแอลฟา ดังแสดงในรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.19 การส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างหน่วยย่อยแอลฟา (Kauppi และคณะ, 1998)

ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอนของหน่วยย่อยบีตาในการเร่งปฏิกิริยาของแนพธาซีนไดออกซิจีเนส จากการศึกษาพบว่าเฉพาะหน่วยย่อยแอลฟาของแนพธาซีนไดออกซิจีเนสเท่านั้นที่ควบคุมความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น ในขณะที่หน่วยย่อยบีตาไม่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาหรือความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (Kauppi และคณะ, 1998; Parales, 2003)

## 2.5 วิธีการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์มาใช้เพื่อตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs เช่น เทคนิคไฮบริไดเซชัน (Hybridization) ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) การโคลน (Cloning) และการกลายพันธุ์ด้วยทรานโปซอน (Transposon mutagenesis) โดยใช้เทคนิคใดเทคนิคหนึ่งหรือใช้หลายเทคนิคร่วมกัน เพื่อวัตถุประสงค์หลายด้าน เช่น เพื่อตรวจหาความเหมือนเบื้องต้นของยีนที่ค้นพบใหม่กับยีนที่ค้นพบแล้ว ศึกษาการกระจายตัวของยีนในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ตรวจหายีนที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เบื้องต้น และเพื่อจุดประสงค์ที่สำคัญ คือ การศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในการทำนายวิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs และสามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้ไปตัดต่อหรือดัดแปลง เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพิ่มขึ้น และสามารถควบคุมภาวะให้เหมาะสมกับการแสดงออกของยีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ประมวลผลจากยีนดังกล่าว ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

### 2.5.1 เทคนิคเซาเธิร์นไฮบริไดเซชัน (Southern Hybridization)

เทคนิคเซาเธิร์นไฮบริไดเซชันสามารถทำได้โดยการสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่ต้องการค้นหา โดยเฉพาะยีนที่ประมวลผลหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสซึ่งมีบริเวณที่ค่อนข้างอนุรักษ์ โดยมากมักจะมีการสร้างดีเอ็นเอติดตามจากยีนของกลุ่มคล้าย *nah* จากเชื้ออื่นที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว จัดว่าดีเอ็นเอติดตามนี้เป็นแบบเฮเทอโรโลกัส (heterologus probe) ซึ่งต้องทำไฮบริไดเซชันในภาวะเข้มงวดต่ำ (low stringency condition) มีหลายรายงานที่ใช้เทคนิคไฮบริไดเซชันในการตรวจหาความเหมือนเบื้องต้นของยีนในเชื้อที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่เพิ่งแยกได้ใหม่กับยีนกลุ่มคล้าย *nah* ข้อได้เปรียบของเทคนิคนี้คือ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวสูง กล่าวคือ แม้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์จะมีความเหมือนกันกับดีเอ็นเอติดตามเพียงบางส่วน แต่ยังสามารถติดตามความเหมือนได้ แต่วิธีการนี้มักใช้เป็นเพียงวิธีการในการตรวจหาความเหมือนเบื้องต้นของยีนที่ต้องการศึกษาเท่านั้น

Sanseverino และคณะ (1993) ใช้ดีเอ็นเอติดตามยีน *nahA* ที่สร้างจากยีนบนพลาสมิด NAH7 ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มาไฮบริดกับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *P. fluorescens* สายพันธุ์ 5R, DFC49 และ DFC50 พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ปรากฏสัญญาณขนาด 15.6 กิโลเบส ในขณะที่ตัวควบคุมผลบวก (พลาสมิด NAH7) ปรากฏสัญญาณขนาด 18.5 กิโลเบส ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มียีนที่คล้ายกับ *nahA* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 จึงให้สัญญาณจากการไฮบริด แต่มีความแตกต่างกันที่รูปแบบแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ

Hamann และคณะ (1999) ใช้ดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับยีน *ndoB* ซึ่งประมวลรหัสเป็น ISP หน่วยย่อยแอลฟาของแนพธาซีนไดออกซิเจเนสใน *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 ในการไฮบริดกับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 20 สายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ ที่คัดแยกได้ พบว่า *Pseudomonas* ที่ย่อยสลายแนพธาซีนให้สัญญาณการไฮบริดที่เข้ม ส่วนเชื้ออีก 5 สายพันธุ์ของ *Gordona*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* และ *Pseudomonas* ที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงให้สัญญาณการไฮบริดที่อ่อน ผลจากการไฮบริดสามารถนำมาประเมินความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในกลุ่มประชากรได้

Laurie และ Lloyd-Lones (1999) ใช้ดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับยีนกลุ่มคล้าย *nahA* ได้แก่ ยีน *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 และยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มาไฮบริดกับยีน *phn* ในเชื้อ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ที่มีความสามารถย่อยสลายพีแนทรีนและแนพธาซีน พบว่ายีน *phn* มีความแตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* เนื่องจากให้ผลลบกับการทดสอบดังกล่าว เมื่อทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ความเหมือนรวมทั้งหน้าที่ของยีนพบว่ายีน *phn* มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่เคยมีรายงานมา

Kulakov และคณะ (2005) ใช้เทคนิคเซาเธิร์นไฮบริดเซชันเพื่อค้นหาว่ายีน *nar* ใน *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038, LB400 และ LB200 อยู่บนโครโมโซมดีเอ็นเอ (chromosomal DNA) หรืออยู่บนพลาสมิด โดยการใช้เทคนิค Pulsed-field gel electrophoresis เพื่อแยก เมกะพลาสมิด (mega-plasmid) ของทั้ง 3 สายพันธุ์ และทำการไฮบริดโดยใช้ส่วนหนึ่งของยีน *nar* จากสายพันธุ์ NCIMB12038 ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบว่าปรากฏสัญญาณใน 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ NCIMB12038 และ LB400 แสดงว่ายีน *nar* ของทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่บนพลาสมิด แต่ปรากฏผลลบในสายพันธุ์ LB200 แสดงว่ายีน *nar* น่าจะอยู่บนโครโมโซมดีเอ็นเอ

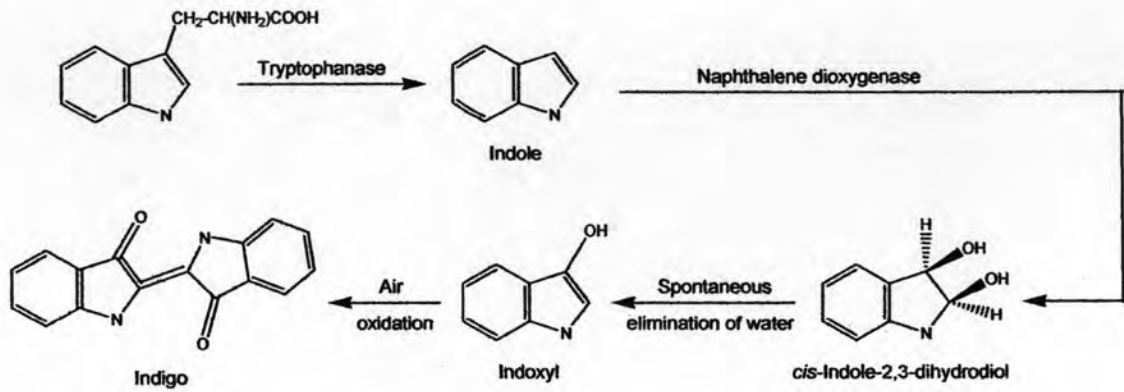
## 2.5.2 การโคลน (Cloning)

เทคนิคการโคลนที่นิยมทำกันมากในปัจจุบัน คือ การโคลนแบบ Shot-gun โดยอาศัยหลักการ คือ ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมแล้วนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้โคลนเข้ายังดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันกับจีโนมิกดีเอ็นเอข้างต้น จากนั้นทำการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งหมดที่ได้เข้ายังเซลล์เจ้าบ้าน แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการออกจากห้องสมุดยีน (genomic library) โดยการแสดงลักษณะฟีโนไทป์ของเซลล์เจ้าบ้านตามที่ต้องการ เช่น การติดตามโคลนที่มียีนไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นยีนสำคัญในการบ่งบอกขั้นตอนถึงความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั่วไป โดยติดตามการเปลี่ยนสีของสารอินโดล (Ensley และคณะ, 1983) เป็นต้น จากการทำวิธีนี้จะได้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ต้องการเก็บอยู่ในรูปแบบที่เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหรือคอสมิด (cosmid) หรือเก็บไว้ในเซลล์เจ้าบ้านได้นาน จึงสามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมนี้มาทำการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์หรือแม้กระทั่งนำยีนไปทำการแสดงออก (expression) หรือตัดต่อ ดัดแปลงยีนให้มีสมบัติได้ตามต้องการ แต่มีข้อเสียคือ การโคลนยีนบางยีนไม่มีระบบการคัดเลือกโคลนที่เหมาะสม จึงไม่สามารถทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการออกจากโคลนทั้งหมดได้

Ensley และคณะ (1983) ได้ใช้การโคลนยีนในส่วน upper pathway จากพลาสมิด NAH7 ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และทำการแสดงออกของยีนใน *E. coli* สายพันธุ์ HB101 จากการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วพบการสะสมของสารอินดิโกสีฟ้าน้ำเงินโดยบังเอิญ เมื่อหาสาเหตุของการปรากฏขึ้นของอินดิโกในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าอินดิโกเกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันระหว่างทริปโตเฟนเนสที่พบใน *E. coli* ทั่วๆ ไปและไดออกซิจีเนสจากส่วนของพลาสมิด NAH7 ในการเปลี่ยนทริปโตเฟนให้เป็นอินโดลและอินดิโกตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.18 จากการทดลองยังได้ทำการยืนยันการทำงานของไดออกซิจีเนสในการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกในเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมต่างๆ ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs และสายพันธุ์กลายที่เกิดการบกพร่องของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนส พบว่าการเกิดสารไดไฮโดรไดออกอลที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส มีส่วนสัมพันธ์กับการปรากฏขึ้นของอินดิโก จากข้อสรุปดังกล่าวจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำปฏิกิริยาดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการทดลองเพื่อหาเชื้อที่ย่อยสลายสารประกอบ PAHs รวมทั้งใช้ในการทดสอบโคลนซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs จากการทดลองหา



ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสในขั้นต้น ด้วยการติดตามความสามารถของเชื้อในการเปลี่ยนแปลงอินโดลไปเป็นอินดิโก



รูปที่ 2.20 ขั้นตอนการเกิดอินดิโกโดยปฏิกริยาร่วมกันระหว่างเอนไซม์ทริปโตเฟเนส และไดออกซิจีเนสใน *E. coli* สายพันธุ์ลูกผสม (Ensley และคณะ, 1983)

Kiyohara และคณะ (1994) ทำการโคลนยีน *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟทาลินและพีแนทรีน จากห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นสามารถคัดเลือกโคลนโดยการวิเคราะห์การทำงานของไดออกซิจีเนสโดยการเปลี่ยนสีของโคโลนี่เป็นสีน้ำเงินเมื่อโคลนสามารถสร้างสารอินดิโกได้ จากนั้นทำการสืบโคลนสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pDI1 ที่มีเฉพาะยีนที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ไดออกซิจีเนสแล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pDI1 มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามและนำไปไฮบริดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 พบว่าสัญญาณจากไฮบริดเซชันเกิดขึ้นกับส่วนที่เป็นโครโมโซมของเชื้อสายพันธุ์นี้ แสดงว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ของเชื้อสายพันธุ์นี้อยู่บนโครโมโซม ซึ่งแตกต่างจากที่เคยพบในเชื้อสายพันธุ์อื่นที่มักจะพบยีนอยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *pahA* มีความคล้ายกับ *nahA* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และ สายพันธุ์ NCIB9816-4 ค่อนข้างมาก

นอกจากรายงานคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยการตรวจหายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสตามวิธีของ Ensley และคณะ (1983) ยังพบบางรายงานที่ใช้วิธีการคัดเลือกโคลนซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่แตกต่างกันไป เช่น คัดเลือกจากการเปลี่ยนสีของสารมัทธยันต์ การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน หรือ Colony hybridization เป็นต้น

Kasuga และคณะ (1997) โคลนยีนที่ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกซิไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) สำหรับ 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล ของ *Terrabacter* sp. สายพันธุ์ DBF63 ที่ย่อยสลายไดเบนโซไพวแรนด้วยวิธี Shot-gun cloning ขั้นตอนการคัดเลือกโคลนทำโดยการวิเคราะห์การทำงานของเอ็กซ์ตราไดออกซิไดออกซิจีเนสด้วยการสเปย์ส่วนผสม แคทีคอล 3-เมทิลแคทีคอล 4-เมทิลแคทีคอล และไดเบนโซไพวแรน ลงบนจานเลี้ยงเชื้อและติดตามโคลนที่ให้โคโลนีสีเหลือง จากการทดลองสามารถโคลนยีน *dbfBC* ที่ประมวลรหัสเอ็กซ์ตราไดออกซิไดออกซิจีเนส และไฮโดรเลสได้ และเมื่อทำ primer walking พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยไดเบนโซไพวแรนไม่ได้อยู่รวมกันเป็น cluster

Iwabuchi และ Harayama (1997) โคลนยีนที่ประมวลรหัส 2-คาร์บอกซีเบนซิลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสจาก *Nocardiodes* sp. สายพันธุ์ KP7 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพีแนนทรีน การคัดเลือกโคลนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยการใช้ degenerated primer ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณปลายด้านอะมิโนจำนวน 29 กรดอะมิโน ของ 2-คาร์บอกซีเบนซิลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่ทำบริสุทธิ์จากเชื้อสายพันธุ์นี้ โคลนที่ต้องการให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 71 bp งานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้โดยมีซันดิเอ็นเอสอดแทรกซึ่งประกอบด้วย 7 ORFs มีส่วนที่เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายพีแนนทรีนผ่านทาง *o*-phthalate ทั้งหมด 3 ยีนและอีก 4 ORFs ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย และพบว่าการจัดเรียงตัวของยีน ORF ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแทรกอยู่ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรีน ยีนจึงไม่อยู่รวมกันเป็น cluster เหมือนกรณียีนในกลุ่มคล้าย *nah*



พบบางรายงานได้ทำการศึกษาอื่นด้วยวิธีการสร้างห้องสมุดยีนบางส่วน (partial gene library) โดยหลักการโคลนจะคล้ายกับการโคลนแบบ Shot-gun แตกต่างกันที่วิธีนี้จะทำการคัดเลือกเพียงบางส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ซึ่งคาดว่ามียีนที่ต้องการอยู่มาทำการโคลนเท่านั้น

Werwath และคณะ (1998) โคลนยีน *gtdA* ที่ประมวลรหัส เจนทีเสต 1,2-ไดออกซิจีเนส ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการย่อยสลายเจนนีเสตจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW5 ด้วยวิธีสร้างห้องสมุดยีนบางส่วน (partial gene library) โดยทำการคัดเลือกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอจากจีโนมมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์และมีขนาดในช่วง 3.5-5 กิโลเบส มาใช้ในการโคลน ทำการคัดเลือกโคลนด้วยวิธีโคลนไฮบริดเซชัน โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามขนาด 1.2 กิโลเบส ที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซึ่งใช้ degenerated primer ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเจนนีเสต 1,2-ไดออกซิจีเนส และใช้จีโนมมิกดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW5 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอทำให้มีการจัดเจนนีเสต 1,2-ไดออกซิจีเนส อยู่ใน Class ใหม่ของเอนไซม์ในกลุ่ม ring-cleavage dioxygenase เนื่องจากมีความแตกต่างจากยีนและเอนไซม์ชนิดเดียวกันในเชื้ออื่นค่อนข้างมาก