บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการตื่นตัวในเรื่องปัญหาสิ่งแวดล้อม พลาสติกเป็นหนึ่งในวัสดุซึ่งทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม พอลิเอทิลีน พอลิไวนิลคลอไรด์ พอลิสเตียรีน เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ส่วนใหญ่ที่ใช้กับอุตสาหกรรมพลาสติก พอลิเมอร์สังเคราะห์ง่ายและสะดวกในการเปลี่ยนรูปร่างและยังมีความทนทานต่อสารเคมีสูงทั้งยังมีความยืดหยุ่นได้ดี นอกจากนั้น ยังสามารถขึ้นรูปเป็นเส้นใย หรือแผ่นฟิล์มบาง มีความคงทนและสะดวกสำหรับการใช้เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์ จากการบันทึกการประมาณการผลิตพลาสติกทั่วโลกใน 1 ปี จะมีการผลิตมากกว่า 100 ล้านตัน (Jogdand, 2004) ปัญหาใหญ่ของพลาสติกที่ทั่วโลกกำลังประสบอยู่ในปัจจุบันคือขยะพลาสติก เนื่องจากพลาสติกเป็นวัสดุย่อยยากต้องใช้เวลายาวนานเป็นร้อยๆปีกว่าที่พลาสติกชิ้นหนึ่งๆ จะสลายได้หมด ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนากระบวนการหลายอย่างเพื่อแก้ปัญหาพลาสติกย่อยยากเหล่านี้ วิธีการหนึ่งก็คือการพัฒนาวัสดุทดแทนที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ แต่มีคุณสมบัติที่สามารถถูกย่อยสลายหรือสลายตัวไปได้โดยวิธีการตามธรรมชาติ ตัวอย่างของวัสดุเหล่านี้ ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHA), พอลิแล็คไทด์ (polylactide), พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) เป็นต้น

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมีข้อดีต่างจากพลาสติกที่สังเคราะห์จากสารในกลุ่มปิโตรเคมี คือถูกย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซี-บิวทิเรต (poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB เป็นพอลิเมอร์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ PHA ที่สังเคราะห์โดยเชื้อจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเทียบเคียงได้กับพลาสติกสังเคราะห์ นอกจากนี้กระบวนการผลิตพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นการหมักโดยจุลินทรีย์ซึ่งสามารถใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติเป็นสารอาหาร และได้ผลิตภัณฑ์ในระยะเวลาอันสั้น การใช้พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรตแทนผลิตภัณฑ์จากปิโตรเคมีจึงนับเป็นวิธีแก้ปัญหาขยะพลาสติกตกค้างวิธีหนึ่งซึ่งจะมีส่วนช่วยรักษาสภาพสิ่งแวดล้อมให้ดีขึ้น (Lee, 1995)

แนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิต PHA แบ่งออกเป็นสองแนวทางใหญ่ คือ การพัฒนากระบวนการหมัก และการพัฒนากระบวนการสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่พัฒนาไปทางด้านหาทางเปลี่ยนแปลงชนิดของสารอาหาร และกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต่างชนิด

ไปจากกระบวนการในปัจจุบัน อย่างไรก็ดี การพัฒนากระบวนการผลิต โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดของสารอาหาร ซึ่งใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Ralstonia eutropha* (ชื่อเดิมคือ *Alcaligenes eutrophus*) ยังนับเป็นแนวทางที่น่าสนใจที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์กลุ่ม PHB ไว้ภายในเซลล์ได้ในปริมาณที่มาก และสามารถใช้สารอาหารที่มีราคาถูกได้หลายชนิดอีกด้วย (Lee, 1995)

การวิจัยและพัฒนาพลาสติกย่อยสลายได้เริ่มต้นมาตั้งแต่ปี 1970 และในปัจจุบันนี้มีความก้าวหน้าถึงระดับที่นำมาใช้ทางการค้าผลิตเป็นอุตสาหกรรม แต่ก็ยังมีการวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการอยู่เพื่อสร้างพลาสติกย่อยสลายได้ให้มีคุณภาพดีที่สุด แม้แนวคิดเรื่องพลาสติกที่ย่อยสลายด้วยกระบวนการชีวภาพจะมีมายาวนานร่วม 30 ปี แต่ความนิยมใช้ยังมีไม่มากนัก เนื่องจากพลาสติกเหล่านี้ราคาแพงกว่าพลาสติกที่สังเคราะห์จากกระบวนการปิโตรเคมีถึง 5 เท่า เนื่องจากต้นทุนในการผลิตที่มีราคาสูงกว่า ด้วยเหตุผลนี้หากเราสามารถหาวิธีลดต้นทุนในการผลิตให้ถูกลง จากข้อมูลทางการศึกษา พบว่า กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนอีกชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ผลิต PHA (Yu, 2001) กรดอินทรีย์สามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักของเสีย หรือน้ำเสียแบบไร้อากาศ การใช้กรดอินทรีย์ที่ผลิตจากการหมักเส้นใยปาล์ม จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนในการผลิต PHA และเป็นการลดของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มส่งผลให้ลดมลพิษพร้อมทั้งได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

การตรวจเอกสาร

1. Polyhydroxyalkanoates หรือ PHA

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) เป็นพอลิเอสเทอร์ของสารไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (hydroxyalkanoate, Ha) ที่สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์หลากหลายชนิดเป็นการสะสมสารคาร์บอน และสารพลังงานไว้ภายในเซลล์ซึ่งเก็บไว้ในลักษณะของเม็ดแกรนูล (granule) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ และยังพบว่ามีสาร Ha มากกว่า 80 ชนิด เป็นหน่วยย่อยของ PHA ซึ่งคุณสมบัติเชิงกลของ PHA จะขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของชนิดและปริมาณหน่วยย่อยของ PHA (Lee, 1995) พอลิเอสเทอร์ในกลุ่มของ PHA เป็นพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น โดยมีองค์ประกอบของโครงสร้างอยู่ในรูป R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R-β-hydroxy fatty acid โดยมีโครงสร้างทั่วไป ดังภาพที่ 1 โดยในการผลิตหน่วยย่อยของ PHA จะขึ้นกับจุลินทรีย์ และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas oleovolans* ผลิตสาร PHA ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ 3 – hydroxyoctanoate เป็นหลัก โดยใช้กรดออกทาโนอิกหรือออกเทน และ *Ralstonia eutropha* หรือที่รู้จักกันในชื่อเดิมคือ *Alcaligenes eutrophus*

สามารถสังเคราะห์ 4-hydroxybutyrate และ 3-hydroxypropionate ได้จาก 4-hydroxybutyric acid และ 3-hydroxypropionic acid ตามลำดับ (Anderson and Wynn, 1995)

Polyhydroxybutyrate (PHB) จัดอยู่ในกลุ่ม PHA ที่มีคุณสมบัติที่ดีในการนำไปผลิตเป็นพลาสติก เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีนซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งเป็นลักษณะที่ดี มีน้ำหนักที่เบา และคุณสมบัติอื่นๆ (Jogdand, 2004) สามารถสรุปได้ดังนี้

1. PHB ไม่ละลายน้ำและสามารถต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้ PHB ต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น
2. PHB สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตร้าไวโอเลต แต่มีความต้านทานต่อกรดและด่างต่ำ
3. PHB มีคุณสมบัติในการซึมผ่านออกซิเจนที่ดี แต่ยังน้อยกว่าพอลิโพรพิลีน
4. PHB ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ
5. PHB มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (biocompatible) และในขณะนี้มีการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์
6. PHB มีจุดหลอมเหลวที่ 171- 182 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิคล้ายแก้ว 5-10 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 MPa
7. PHB จมน้ำในขณะที่พอลิโพรพิลีนลอยตัวในน้ำ การจมตัวของ PHB ก่อให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศ
8. PHB ไม่มีความเป็นพิษ

ประโยชน์ของการนำ PHB ไปประยุกต์ใช้ (Jogdand, 2004)

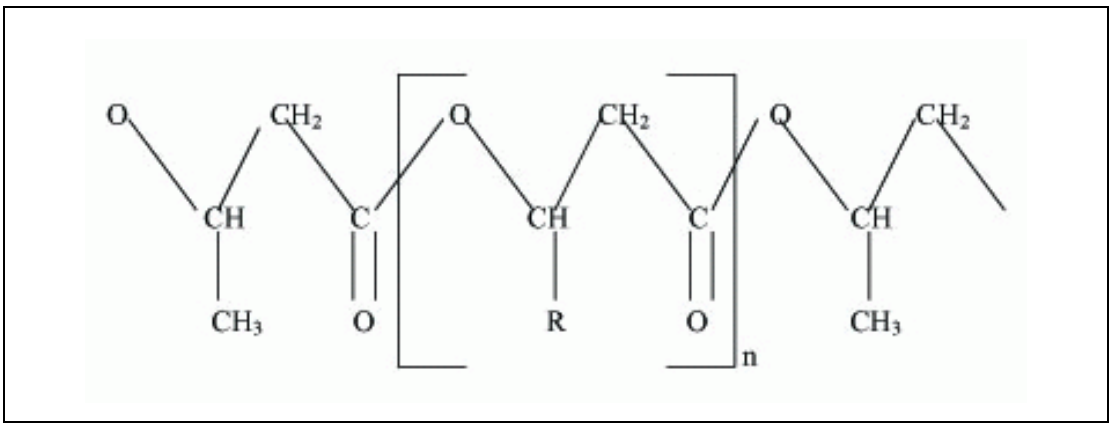
1. ฟิล์มบรรจุภัณฑ์ (สำหรับจัดเก็บอาหาร) กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก
2. ใช้เป็นตัวห่อหุ้มที่ย่อยสลายได้ เพื่อค่อยๆ ปลดปล่อยสารที่บรรจุอยู่ภายในออกมาอย่างช้าๆ เช่น ยา สารกำจัดแมลง สารกำจัดวัชพืช ปุ๋ย เป็นต้น
3. อุปกรณ์ที่ใช้เพียงครั้งเดียวแล้วทิ้ง (disposal items) ตัวอย่างเช่น มีดโกน เครื่องใช้ในครัวเรือน ผ้าอ้อม ขวดแชมพู กล่องบรรจุเครื่องสำอาง ถ้วยพลาสติก เป็นต้น
4. ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารพวก chiral compound
5. การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ PP เปรียบเทียบกับ PHB

Table 1. Comparison properties between PP with PHB.

Parameter	Polypropylene (pp)	PHB
Melting point Tm [^{0}C]	171-186	171-182
Glass Transition Temperature Tg [^{0}C]	-15	5-10
Crystallinity [%]	65-70	65-80
Density [g cm^{-3}]	0.905 - 0.94	1.23 - 1.25
Molecular weight Mw (x10^{-5})	2.2 - 7	1 - 8
Molecular weight distribution	5 - 12	2.2 - 3
Flexural modulus [GPa]	1.7	3.5 - 4
Tensile strength [MPa]	39	40
Extension to break [%]	400	6 - 8
UV resistance	poor	good
Solvent resistance	good	poor
Oxygen permeability [cm^{3}m^{-2}atm^{-1}d^{-1}]	1700	45
Biodegradability	-	good
US Annual production [M. tones]	1.8	not determined
Other	due to low density floats in aquatic system	due to more density goes to the sediment in aquatic system.

ที่มา : Jogdand (2004)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

Figure 1. Chemical structure of polyhydroxyalkanoates.

ที่มา : Khanna และ Srivastava (2005)

1.1. การแบ่งกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

PHA เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายชนิด และเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน จากการจำแนกองค์ประกอบของ PHA พบว่า มีหน่วยย่อยหรือมอนอเมอร์ ชนิดต่างๆ มากกว่า 100 ชนิด รวมกันเกิดเป็นสายพอลิเมอร์ยาว หรือสั้นขึ้นอยู่กับจำนวนมอนอเมอร์ที่มาต่อรวมกัน (Doi, 1990) ซึ่ง PHA สามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์ เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1.1.1. โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer)

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของพอลิเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกันซึ่งในกรณีนี้จะยกตัวอย่างของการเชื่อมต่อกันของ R-β-hydroxy fatty acid ชนิด β-hydroxybutyrate ซึ่งมีหมู่เมธิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีมอนอเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยมีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์คือ พอลิโพรพิรีน พบว่า *Alcaligenes eutrophus* ATCC 29713 มีความสามารถในการผลิต PHB ได้ดีในสภาวะการเลี้ยงแบบกึ่งกะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Grothe *et al.*, 1999)

1.1.2. โคพอลิเมอร์ (copolymer)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นจากมอนอเมอร์มากกว่า 2 ชนิดมาต่อรวมกัน ในกรณีของโคพอลิเมอร์ของสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโควารีเรต นอกจากมอนอเมอร์ที่เป็นไฮดรอกซีบิวทิเรตแล้ว จะมีการเชื่อมต่อกับมอนอเมอร์ของไฮดรอกซีวารีเรตทำให้เกิดเป็นโคพอลิเมอร์ P(3HB – 3HV) หรือที่เรียกว่า poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรกลูโคสที่มีการเติมกรดโพพิโอนิกร่วมกัน และจากการศึกษาของ Lee และคณะ (2004) ได้พบว่า *Comamonas acidovorans* สามารถผลิต poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) โดยใช้กลูโคสและ1,4-butanediol เป็นแหล่งคาร์บอน

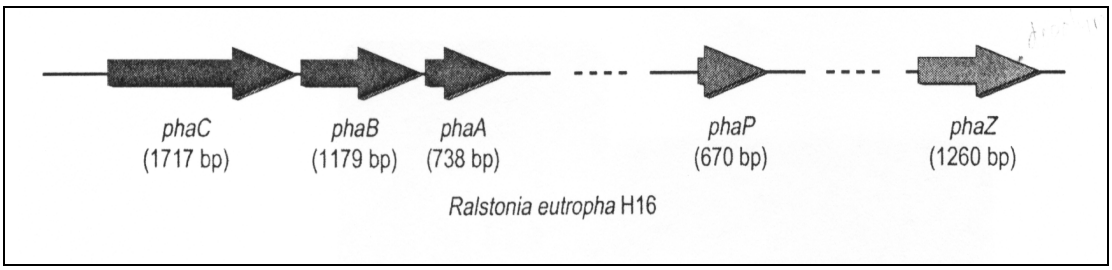
1.2 กระบวนการสังเคราะห์ PHA

PHA เป็นสารกลุ่มพอลิเอสเทอร์ซึ่งประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ (R)-3HA ซึ่งสารจะอยู่ในรูป R Configuration ทำให้มีความจำเพาะของสเตอริโอไอโซเมอร์ของการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของเอนไซม์ PHA synthase และมีเพียงส่วนน้อยที่มีลักษณะเป็นส่วนหนึ่งของเอสมอนอเมอร์ที่ตรวจพบโดยส่วนใหญ่จะรู้จักสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตกันดีในชื่อของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตประกอบขึ้นจากหน่วยของ (R)-3HB มอนอเมอร์จะถูกสังเคราะห์ไปเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อยู่ในช่วง 200,000 – 3,000,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะในการเจริญของเชื้อ (Sudesh *et al*., 2000)

1.2.1 กลไกการทำงานของเอนไซม์

การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดต่างๆ จะมีเอนไซม์ PHA synthase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอน ในการสะสมสาร PHA ในเซลล์นั้นจะมีเอนไซม์อยู่รอบๆ พื้นผิวของ PHA granule นอกจากนี้ยังมีโปรตีน phasin และ specific regulator proteins ซึ่งมีความสำคัญและน่าสนใจ เมื่อการสังเคราะห์ PHA เป็นอิสระจากแม่แบบ และเริ่มกระบวนการของเอนไซม์ทำให้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีความหลากหลาย และมีความสัมพันธ์กับการเกิดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มียีนมากกว่า 60 ชนิด ของเอนไซม์ PHA synthase จากการโคลนและศึกษาลำดับเบสของแบคทีเรีย และลำดับเบสของเอนไซม์ PHA synthase มีการบันทึกองค์ประกอบของหน่วยย่อยและความจำเพาะต่อสารอาหารของกลุ่มเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 3 กลุ่ม ซึ่งมีผลในการรวมตัวกันของกรดอินทรีย์สายสั้น หรือสายกลาง (Alexander and Tina, 2003)

การควบคุมการผลิต PHA นั้นพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ *pha*CBA cluster ดังภาพที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย *pha*A, *pha*B และ *pha*C โดย *pha*A เป็นส่วนที่ควบคุมสำหรับการผลิตเอนไซม์ β-ketothiolase โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลง acetyl-coA ไปเป็น acetoacetyl-coA สำหรับ *pha*B เป็นส่วนที่ควบคุมการผลิตหรือสร้างเอนไซม์ NADPH-oxidoreductase ซึ่งทำการเปลี่ยน acetoacetyl-coA ให้เป็น R-3-hydroxybutyryl-coA และสำหรับ *pha*C เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ PHA polymerase โดยทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์จาก R-3-hydroxybutyryl-coA ส่วน *pha*P ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัว ของ PHA granule นั้นคือโปรตีน phasin ซึ่งเป็น low-molecular weight protein โดยมีการสะสมเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ และมีหน้าที่ส่งเสริมการผลิตด้วยการเชื่อมกับ granule เพื่อทำการควบคุมขนาด จำนวน และพื้นที่ผิวของ PHA inclusion การสังเคราะห์และการสะสม phasin เป็นกลไกที่เกิดขึ้นร่วมกับ *pha*R ซึ่งเป็น autoregulate repressor อย่างไรก็ตาม การควบคุมขนาด และจำนวนของ PHA inclusion ก็ยังขึ้นกับปริมาณของ *pha*C ที่มีอยู่ในเซลล์อีกด้วย และยังมี *pha*Z ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ depolymerase เพื่อใช้ปลดปล่อย R-3-hydroxybutyrate เมื่อมีการขาดไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า *pha*Z จะทำการผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ ซึ่งต้องอาศัยตัวกระตุ้น เช่น ทริปซิน เป็นตัวกระตุ้นทำให้มีข้อสังเกตว่า *pha*Z จะผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปของ proenzyme ในขณะเดียวกันการสลาย PHB granule จำเป็นต้องอาศัย proteolytic enzyme ร่วมเช่นกัน มีการคาดการว่า depolymerase น่าจะทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิด (Luengo *et al*., 2003)



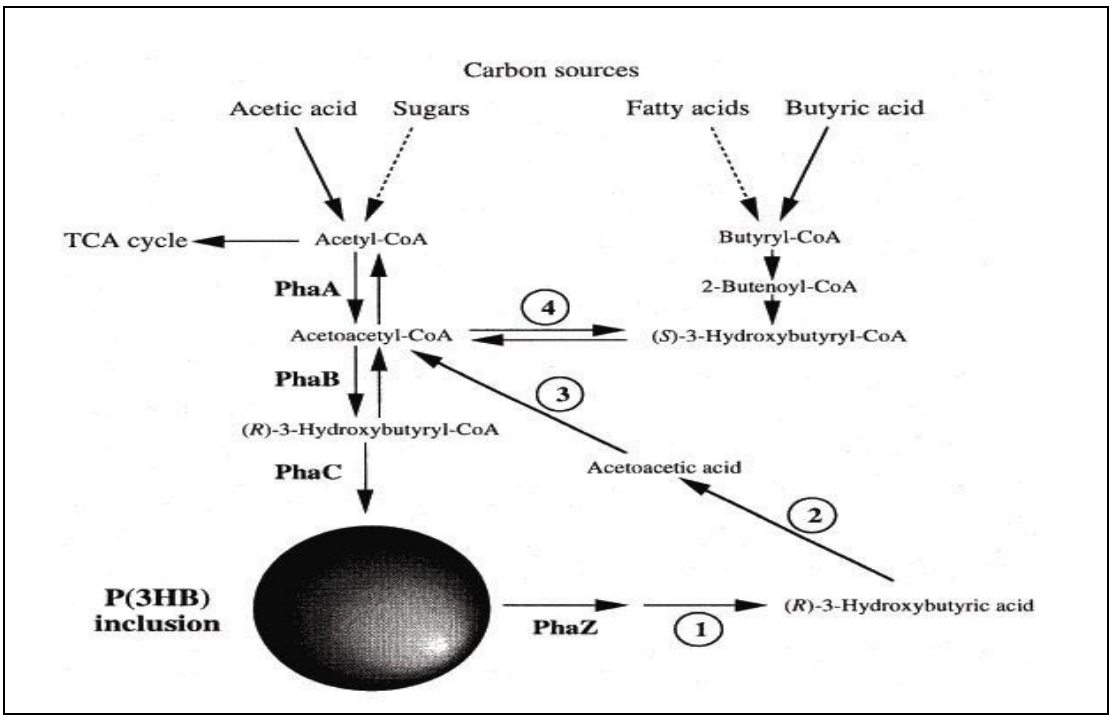
ภาพที่ 2 ลักษณะ *pha*CBA cluster ของ *Ralstonia eutropha* H16

Figure 2. Characteristic of *pha*CBA cluster of *Ralstonia eutropha* H16

ที่มา : ดัดแปลงจาก Luengo และคณะ (2003)

1.2.2 การสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

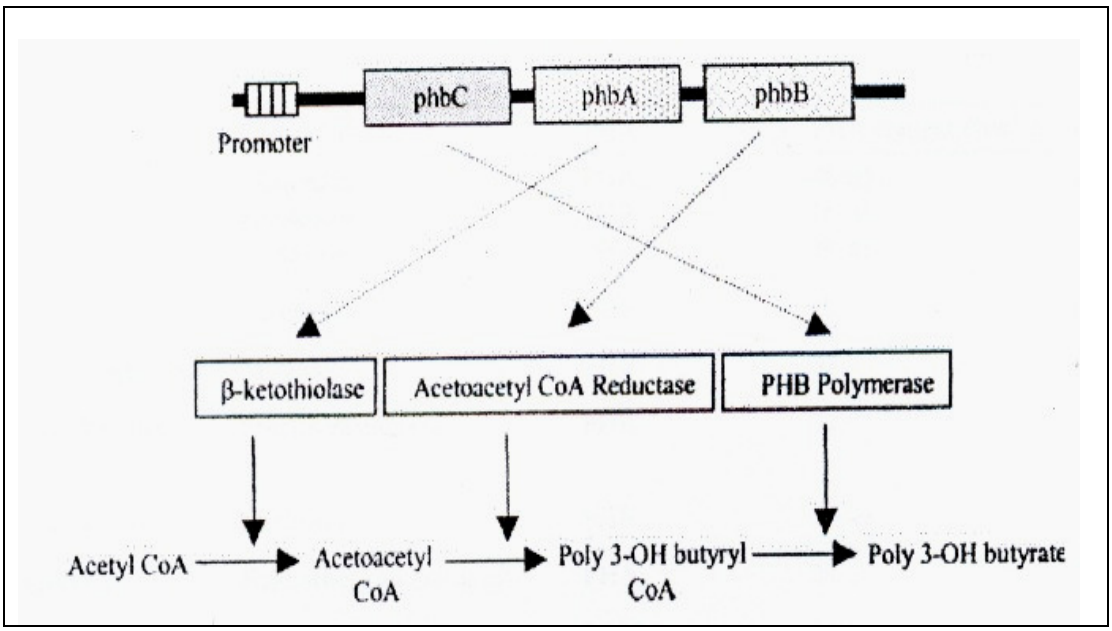
วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ดังแสดงในภาพที่ 3 มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยเริ่มต้นจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ เปลี่ยนไปเป็น อะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ ด้วยการทำงานของเอนไซม์เบต้า – คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-coA reductase) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ ไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthase อย่างไรก็ตาม PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่ม PHA depolymerase (Sudesh *et al*., 2000) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ของแต่ขั้นตอนในการสังเคราะห์ PHB นั้นเกิดจากการแสดงออกของ *pha* CBA cluster (Reddy *et al*., 2003) ดังแสดงในภาพที่ 4 PHB ถูกสะสมไว้ภายใน granule ที่มีขนาดต่างๆ กัน โดยถูกล้อมรอบด้วย phospholipid monolayer และ phasin รวมถึงเอนไซม์ polymerase และ depolymerase รวมถึง unknown protein สำหรับหน้าที่ของ phospholipid envelope คาดว่าเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับน้ำ ซึ่งเป็นการป้องกันการเปลี่ยนแปลงจาก amorphous lipid state ไปเป็น crystalline form และแสดงให้เห็นถึงหน้าที่ในการเป็น protective barrier ป้องกันตัวเซลล์ถูกทำลายจากการมีปฏิสัมพันธ์กับ PHB และโครงสร้างอื่นๆ รวมถึง cytosic protein (unknown protein) ถ้า phospholipid monolayer มีความจำเป็นต่อการป้องกันตัวเซลล์จากกระบวนการสร้าง PHB ในช่วงเริ่มต้น แล้วสามารถตั้งข้อสังเกตได้ว่า envelope ที่เกิดขึ้น จะถูกเพิ่มขึ้นรอบๆ PHB granule ดังนั้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ monolayer ก็ย่อมมีส่วนร่วมกับเอนไซม์ polymerase



ภาพที่ 3 วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและการย่อยสลายในแบคทีเรีย

Figure 3. Poly – hydroxybutyrate synthesis pathways and degradation in bacteria.

ที่มา : Sudesh และคณะ (2000)



ภาพที่ 4 การแสดงออกของ *pha*CBA cluster สำหรับการสังเคราะห์ PHB

Figure 4. Expression of *pha*CBA cluster for poly – hydroxybutyrate synthesis.

ที่มา : Reddy และคณะ (2003)

1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA

การผลิตหรือการสังเคราะห์พอลิเมอร์ โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้นจะต้องคำนึงถึงหลายๆ ปัจจัยที่จะมีผลต่อชนิด และคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้เนื่องจากมีกลไกการสังเคราะห์ที่ซับซ้อน ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม ดังนั้นควรจะศึกษารายละเอียด และสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่ต้องการ ซึ่งมีปัจจัยที่สำคัญดังนี้

1.3.1 เชื้อจุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิตจากการศึกษาผลของสายพันธุ์จุลินทรีย์ พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ก็จะมีผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย (Anderson and Wynn, 1995) กล่าวคือบางสายพันธุ์ของจุลินทรีย์อาจผลิตพอลิเมอร์ออกมาในรูปโฮโมพอลิเมอร์ ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิตพอลิเมอร์ออกมาในรูปโคพอลิเมอร์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการผลิตสาร PHB จากจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่า จุลินทรีย์ แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 และในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์

ตารางที่ 2 การสะสมสาร PHB ในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Table 2. Accumulation of poly – hydroxybutyrate in micro-organisms.

Organisms with PHB accumulation	**PHB accumulation (% of dry cell weight)**
Alcaligenes eutrophus	96
Azospirillum	75
Azotobacter	73
Baggiatoa	57
Leptothrix	67
Methylocystis	70
Pseudomonas	67
Rhizobium	57
Rhodobacter	80

ที่มา : Jogdand (2004)

เชื้อจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Ralstonia eutropha*) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการวิจัยค้นคว้าเพื่อใช้ผลิต PHB กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดนี้มีความสามารถที่จะสะสม PHB ไว้ภายในเซลล์ได้มากถึงประมาณร้อยละ 80 โดยน้ำหนักเซลล์ โดยการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนง่ายๆ เช่น กลูโคส ซึ่งจากการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องของเชื้อจุลินทรีย์ *A. eutrophus* โดยการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้คงที่ 10 – 20 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้สูงถึง 164 กรัมต่อลิตร ได้สาร PHB 121 กรัมต่อลิตร ภายใน 50 ชั่วโมง หรือคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 2.42 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง (Kim *et al.*,1994)

Bomann และ Roth (1999) ทำการผลิต PHB จากเชื้อ *Methylobacterium rhodesianum* กับ *R. eutropha* ในอาหารเคซีนไฮโดรไลเซต ซึ่งมีการเติมกลีเซอรอล พบว่าเชื้อ *M. rhodesianum* สามารถผลิต PHB ได้ร้อยละ 39 ของน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 92 ชั่วโมงจากการเลี้ยงในฟลาสก์ แต่เมื่อทำการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ พบว่า ที่เวลา 45 ชั่วโมงเชื้อผลิต PHB สูงถึงร้อยละ 50 ในขณะที่เชื้อ *R. eutropha* สามารถผลิตได้ร้อยละ 47 หลังการเลี้ยงประมาณ 67 ชั่วโมงในฟลาสก์ แต่เมื่อทำการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ พบว่า ที่เวลา 45 ชั่วโมงเชื้อผลิต PHB สูงถึงร้อยละ 65

1.3.2 แหล่งอาหาร

1.3.2.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการผลิต PHA กระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHA จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดและภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือเมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอแต่มีการจำกัดปัจจัยบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน หรือฟอสฟอรัส เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาถึงชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จึงจะทำให้การผลิตเกิดขึ้นได้ดี นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถผลิต PHA ได้จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

Lee และ Yu (1997) ได้ศึกษาการการผลิต PHA จากตะกอนสลัดจ์ชุมชนในระบบสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการย่อยสลายตะกอนสลัดจ์แบบไร้อากาศ และนำส่วนของเหลวที่ผ่านจากขั้นตอนแรกมาเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* เพื่อผลิต PHA ในถังหมักที่มีการกวน 50 rpm และให้อากาศ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการควบคุม pH และมีการควบคุมปริมาณไนโตรเจน ผลการทดลอง พบว่า หลังจากการเลี้ยง *A. eutrophus* สามารถลดปริมาณกรดส่วนของเหลวที่ผ่านจากขั้นตอนแรก และเป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนที่สอง ได้ดังนี้คือ กรดอะซิติกลดลงร้อยละ 87.6 กรดโพรพิโอนิกลดลงร้อยละ 62.6 กรดบิวทิริกลดลงร้อยละ 56.8 และกรดวาเลอริกลดลงร้อยละ 32 สามารถผลิต PHA ได้ 0.61 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 34 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Boom และคณะ (1994) พบว่า *A. eutrophus* NCIM 11599 สามารถผลิต PHB โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นการเลี้ยงแบบกึ่งกะโดยทำการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสอยู่ที่ 10 - 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้มีอย่างจำกัด ซึ่งพบว่าสามารถส่งเสริมให้การผลิต PHB สูงขึ้นเป็นร้อยละ 76 ของน้ำหนักแห้ง

Yu (2001) ศึกษาการผลิต PHA จากน้ำเสียที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ โดยใช้กระบวนการหมักสองขั้นตอนโดยขั้นตอนแรกใช้ระบบไร้อากาศ UASB (upflow anaerobic sludge blanket) ได้กรดไขมันระเหยง่ายออกมาร้อยละ 43 โดยกรดไขมันระเหยนี้จะประกอบด้วย กรดอะซิติก ร้อยละ 60 –80 กรดโพรพิโอนิกร้อยละ 10 – 30 และกรดบิวทิริกร้อยละ 5 –40 หลังจากนั้นนำน้ำที่ออกจากระบบ UASB ไปกรองเพื่อนำสวนใสไปใช้ในขั้นตอนที่สองเพื่อผลิต PHA โดยมีกรดไขมันระเหยง่ายเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติม Na_2HPO_4 4.8, KH_2PO_4 2.65 และ $MgSO_4$ 0.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อเชื้อ *A. eutrophus* ในสภาวะมีอากาศในขั้นตอนที่สอง สามารถผลิต PHA ได้ 1.2 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 34 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 3 เชื้อจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHA

Table 3. Micro-organisms and carbon source for PHA production.

เชื้อจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน
Alcaligenes eutrophus	glucose, fructose, acetic acid, propionic acid
Alcaligenes latus	glucose, sucrose, molass, sugar syrup
Anabaena cylindrica 10 c	glucose, acetic acid, propionic acid
Azotobacter chroococcum	starch
Bacillus megaterium	glucose
Methylobacterium sp.	methanol
Protomonas extorquens	methanol, n-amyl alcohol
Pseudomonas cepacia	lactose, xylose
Pseudomonas oleovorans	medium-chain-length (MCL)-alkane, alkanols, alkanoate
Recombinant *Escherichai coli*	whey
Rhizobium meliloti	sucrose
Rhodococcus ruber	glucose

ที่มา : ดัดแปลงจาก Khanna และ Srivastava (2004)

1.3.2.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูป สารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เคซีนเปบโตน ยีสต์สกัด และ corn-steep liqour รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ การเติมเกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) ต่างๆ สำหรับการผลิตสาร PHB พบว่า จะเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอ แต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัดกล่าวคืออัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับไนโตรเจนมีค่าสูง

Grothe และคณะ (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ระดับเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้มีค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio = 28.3) ซึ่งมีผลให้มีการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 4.6 กรัมต่อลิตร

1.3.2.3 อาหารเสริมเกลือแร่

การสะสม PHB จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล โดยมีปัจจัยบางชนิดจำกัด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือ ซัลเฟอร์ ซึ่งพบว่า ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ นั้นจัดเป็นแร่ธาตุหลัก (major element) จุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุเหล่านี้ในปริมาณมากพอสมควรโดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมซึ่งจำเป็นมากเนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้าง และการถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ ดังนั้นในการสังเคราะห์พอลิเมอร์จะมีการจำกัดปริมาณแร่ธาตุหลักเหล่านี้ ซึ่งมีผลให้เกิดการสะสมแหล่งคาร์บอน และพลังงานอยู่ในเซลล์ในรูปพอลิเมอร์

Ryu และคณะ (1996) ได้ศึกษาการผลิต PHB โดยเลี้ยง *A. eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีปริมาณฟอสเฟตจำกัด มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.8 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก อุณหภูมิในการหมัก 34 องศาเซลเซียส มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการศึกษาผลิต PHB ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น KH_2PO_4 เท่ากับ 2.2, 3.1, 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นสามารถผลิตเซลล์และ PHB สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเซลล์และ PHB สูงที่สุด เท่ากับ 281 และ 232 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายใน 74 ชั่วโมง แต่การเจริญจะช้ากว่าที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้น 4.3 กรัมต่อลิตรเล็กน้อย จากการทดลองที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ภายใน 35 ชั่วโมงแรก ปริมาณเซลล์และ PHB จะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยขณะที่ปริมาณฟอสเฟตจะลดลงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งปริมาณฟอสเฟตประมาณ 0.4 กรัมต่อลิตร ภายหลัง 35 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์และ PHB จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วขณะที่ปริมาณฟอสเฟตมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก โดยที่ในระหว่างการหมักจะมีการเติมแอมโมเนียมอย่างเพียงพอ (อยู่ในช่วง 0.6 – 2.8 กรัมต่อลิตร)

Grothe และคณะ (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่มีการเติมธาตุอาหารรอง ต่อการเจริญและผลิตสาร PHB ของเชื้อ *Alcaligenes latus* ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติมธาตุอาหารรอง $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01, $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 10, H_3BO_3 0.3, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.03, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2, $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ 0.03, Ammonium Fe (III) citrate 6 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเจริญและผลิตสาร PHB สูงขึ้นเป็น 6.8 และ 3.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

1.3.2.4 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB เนื่องจากในสภาวะออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทสและไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนสจะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิทิลเอนไซม์เอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอเพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส จึงมีการสะสม PHB ซึ่งการที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัดยังมีผลต่อการลดการทำงานของกระบวนการหายใจในขณะที่ PHB จะทำหน้าที่เป็นแอ่งเก็บสารที่มีอนุภาพรีดิวซิ่ง (reducing power) หรือเป็นหน่วยควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox regulator) ภายในเซลล์ (Luengo *et al.*, 2003)

1.3.2.5 พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHB พบว่าเมื่อต้องการผลิต PHB ควรทำการควบคุมพีเอชไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไปเมื่อสิ้นสุดการเจริญ

Grothe และคณะ (1999) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของพีเอชต่อการผลิต PHB ของเชื้อ *A. latus* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ศึกษาในช่วง 6.0 – 8.5 พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 6.0 –7.5 และผลิต PHB ได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 6.5 ซึ่งมีการผลิต PHB สูงถึง 3.6 กรัมต่อลิตร

1.3.2.6 อุณหภูมิ

ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHB ในช่วง 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ และการผลิต PHB

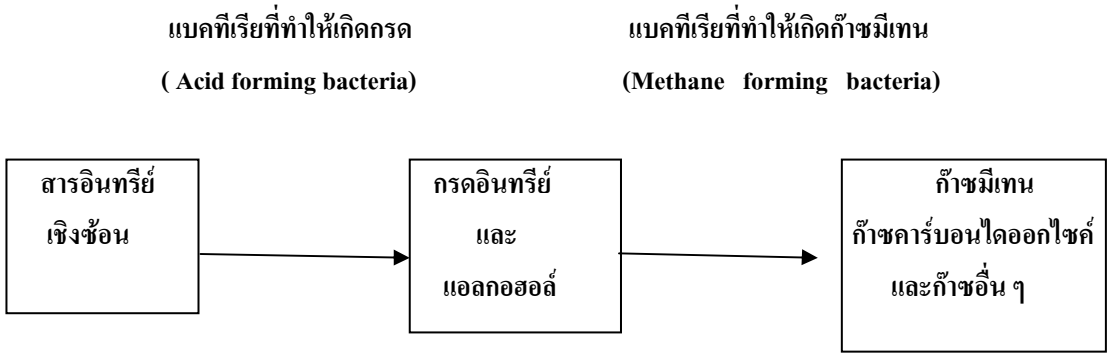
Shimizu และคณะ (1990) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHB ในเชื้อ *A. eutrophus* โดยศึกษาอุณหภูมิในช่วง 25 – 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ และการผลิต PHB ได้สูงถึง 0.8 กรัมต่อลิตร

2. กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids)

หมู่คาร์บอกซิล (–COOH) เป็นหมู่ฟังก์ชันในสารประกอบอินทรีย์และสารที่มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นองค์ประกอบ เรียกว่ากรดคาร์บอกซิลิกหรือกรดอินทรีย์ ซึ่งอาจมีเรซิดิวเป็นอะโรมาติก (Ar-COOH) หรืออะลิฟาติก (R-COOH) ก็ได้ กรดคาร์บอกซิลิกจะแสดงสมบัติของกรดได้เมื่อละลายน้ำ เช่น เปลี่ยนสีกระดาษลิตมัสเป็นสีแดง และสะเทินเบสแก่ได้เกลือกับน้ำ

2.1 การผลิตกรดคาร์บอกซิลิก

กระบวนการย่อยชีวมวลและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดคาร์บอกซิลิก กระบวนการเกิดกรดคาร์บอกซิลิกโดยใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์ ประกอบด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีเป็นสองขั้นตอน ดังภาพที่ 5



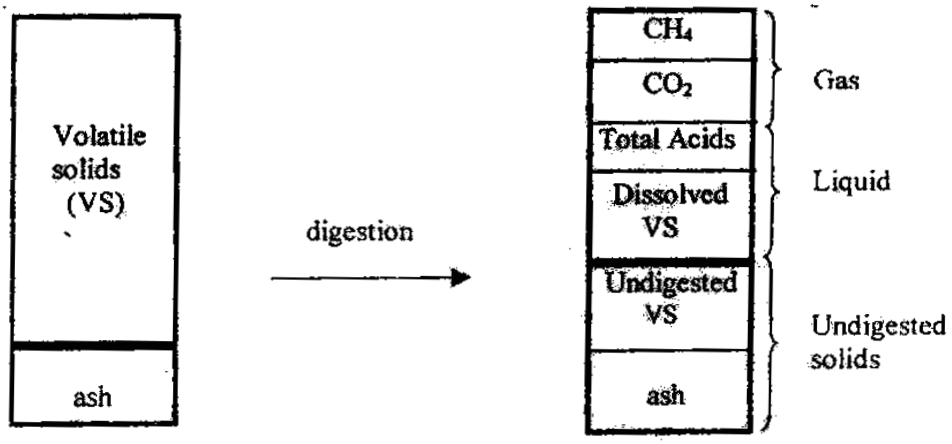
ภาพที่ 5 การย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์

Figure 5. Organic matter degradation by micro-organisms.

ที่มา : เสริมพล รัตสุข และ ไชยยุทธ์ กลิ่นสุคนธ์ (2525)

ในขั้นตอนแรกสารอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งเป็นสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส จะถูกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolytic bacteria) ทำการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาล จากนั้นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า กลุ่มผลิตกรด (acid forming bacteria) ปล่อยเอนไซม์ออกมาเพื่อไฮโดรไลซ์ และทำการย่อยน้ำตาล เพื่อผลิตกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก และกรดไพรพิโอนิก เป็นต้น (เสริมพล รัตสุข และ ไชยยุทธ์ กลิ่นสุคนธ์, 2525)ในการผลิตกรดคาร์บอกซิลิกจึงต้องเติมสารยับยั้งการเกิดก๊าซมีเทน เช่น โบรโมฟอร์ม, กรดโบรโมอี-เทนซัลโฟนิก และไอโอโดฟอร์มเพื่อทำการยับยั้งการสร้างมีเทนอย่างไรก็ตาม การเติมสารยับยั้งมีเทนทำให้มีการสะสมของไฮโดรเจนที่สร้างขึ้นซึ่งจะไปรวมกับกรดคาร์บอกซิลิกสายสั้น เช่น กรดอะซิติก ทำให้ได้กรดคาร์บอกซิลิกที่เป็นสายยาว เช่น กรดบิวทิริก เป็นต้น (Sauer and Teacher, 1987 อ้างโดย Thanakoses *et al*., 2003) และในระหว่างกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรด คาร์บอกซิลิก มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อเป็นบัฟเฟอร์ในการควบคุม pH ให้อยู่ในระหว่าง 6.0 – 6.5 ทำให้ลดการเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ (product inhibition) (Thanakoses *et al*., 2003)

โดยทั่วไปสารอินทรีย์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นของแข็งระเหยได้ (volatile solids, VS) และเถ้า (ash) ภาพที่ 6 การย่อยสลายสารอินทรีย์จากของแข็งระเหยได้ไปเป็นก๊าซและผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลว รวมทั้งของแข็งที่ไม่ถูกย่อยสลาย ในการย่อยสลายแบบไร้อากาศ ในผลิตภัณฑ์ของเหลวจะประกอบด้วยกรดคาร์บอกซิลิกและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น โปรตีนและน้ำตาลบางส่วนที่ละลายน้ำได้ ส่วนในก๊าซผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่คือ ก๊าซมีเทนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 6 การย่อยสลายชีวมวล

Figure 6. Biomass degradation.

ที่มา : Thanakoses และคณะ (2003)

Thanakosess และคณะ (2003) ได้ศึกษาการผลิตกรดคาร์บอกซิลิกจากซากต้นข้าวโพด (corn stover) ที่ผ่านการแปรสภาพ (pretreatment) ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 0.1 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของชีวมวล โดยใช้จุลินทรีย์ผสมจากกระเพาะวัว เติมมูลหมูที่ผ่านการทำแห้งเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน, เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อเป็นบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอชให้อยู่ประมาณ 6.5, เติมของเหลว deoxygenate water เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเติมไอโอโดฟอร์มเป็นสารยับยั้งการสร้างมีเทน ทำการหมักในขวดปฏิกรณ์ขนาด 1 ลิตร แบบไร้อากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตกรดคาร์บอกซิลิกได้ 12 – 24 กรัมต่อลิตร โดยมีกรดอะซิติกร้อยละ 35–45 กรดโพนพิโอนิกร้อยละ 12–20 กรดบิวทิริกร้อยละ 15–23 กรดวาเลอริกร้อยละ 10–13 กรดคาโพรอิกร้อยละ 6–15 และกรดเฮพทาโนอิกร้อยละ 1–9 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการผลิตกรดคาร์บอกซิลิกจากกากชานอ้อยที่ผ่านการแปรสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมจากกระเพาะวัว และจากตะกอนดินชายทะเลเติม มูลไก่ที่ผ่านการทำให้แห้งเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า สามารถผลิตกรดคาร์บอกซิลิกได้ 9 – 21 กรัมต่อลิตร โดยมีกรดอะซิติก ร้อยละ 35–45 กรดโพรพิโอนิกร้อยละ 16–27 กรดบิวทิริกร้อยละ 10–20 กรดวาเลอริกร้อยละ 10–14

กรดคาโพรอิกร้อยละ 5–10 และกรดเฮพทาโนอิกร้อยละ 1–11 โดยการใช้จุลินทรีย์จากตะกอนดินชายทะเลสามารถให้ปริมาณกรดคาร์บอกซิลิกที่สูงกว่าการใช้จากกระเพาะวัว (Thanakosess, 2002 อ้างโดย Thanakosess และคณะ 2003)

Huang และคณะ (2002) ศึกษาการหมัก corn meal hydrolysate โดยการตรึงเซลล์ใน fibrous-bed bioreactor ในการผลิตกรดคาร์บอกซิลิก โดยการไฮโดรไลเซท corn meal ด้วยเอนไซม์ amylase ที่ 60 องศาเซลเซียส และในการผลิตกรดจะใช้จุลินทรีย์ในการตรึงเซลล์ดังนี้ *Lactococcus lactis* และ *Clostridium fomicoaceticum* ในการผลิตกรดอะซิติก *Propionibacterium acidopropionici* ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก และ *Clostridium tyrobutylicum* ในการผลิตกรดบิวทิริก สำหรับการหมักกรดอะซิติกจะควบคุมอุณหภูมิและ pH ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 7.6 ตามลำดับ ที่ 32 องศาเซลเซียส และ 6.0 สำหรับการหมักกรดโพรพิโอนิกและที่ 37 องศาเซลเซียส และ 6.0 สำหรับการผลิตกรดบิวไทริก พบว่า สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, กรดโพรพิโอนิกได้ 2.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และกรดบิวไทริก 6.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

3. การสกัดแยกพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนปกติประกอบด้วยการแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นนำเซลล์จุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมได้ไปเข้ากระบวนการย่อยเซลล์เพื่อทำให้เซลล์แตกออก และปลดปล่อยพอลิไฮดรอกซี-อัลคาโนเอตที่สะสมไว้หลุดออกมา หลังจากแยกเอากากชีวมวลออกจึงนำเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ในขั้นตอนการแยกเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักใช้วิธีการแยกเซลล์ตามปกติธรรมดาซึ่งมักอาศัยกระบวนการแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหรืออาศัยเพียงการกรองก็สามารถแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักได้ สำหรับในขั้นตอนถัดไปเป็นการย่อยให้เซลล์แตกเพื่อแยกเอาพอลิไฮดรอกซี-อัลคาโนเอตที่อยู่ภายในออกมา สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

- การย่อยเซลล์ และสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตออกด้วยตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เมทธิลีนคลอไรด์ (Methylene Chloride) โพรพิลีนคาร์บอเนต (Propylene Carbonate) และไดคลอโรอีเทน (Dichloroethane) แต่กระบวนการสกัด พอลิไฮดรอก-ซีอัลคาโนเอตออกด้วยตัวทำละลายนี้ จะได้สารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 5 น้ำหนักต่อปริมาตรของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งมีความหนืดสูงมาก ทำให้กระบวนการแยกเศษชีวมวลออกไปทำได้ยาก จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากจนให้ผลไม่คุ้มค่ากับการลงทุนถึงแม้จะมีการหมุนเวียนนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ (Lee, 1995)

- การย่อยเศษชีวมวลที่ไม่ใช่พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย วิธีนี้จะช่วยย่อยสลายเศษชีวมวลออกไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์จะไปย่อยสลายสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยเช่นกัน และนอกจากนี้ยังมีผลทำให้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่แยกสกัดได้มีคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้งานหลายๆด้าน

- การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เอนไซม์ กระบวนการนี้ประกอบด้วยการให้ความร้อนกับชีวมวลแล้วนำไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ จากนั้นนำไปล้างด้วยสารละลายซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ เพื่อละลายเอาเศษชีวมวลออกจากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต แต่ผลที่ได้จากกระบวนการนี้มักจะมีความบริสุทธิ์ที่ไม่สูงนัก ในกรณีที่ต้องความบริสุทธิ์สูงๆ ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการแยกสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูงขึ้น (Hocking and Marchessault, 1992)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิต PHA ของ *Ralstonia eutropha* ในการเพาะเลี้ยงแบบกะโดยใช้กรดคาร์บอกซิลิกที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์ม
2. เพื่อศึกษาการผลิต PHA ของ *Ralstonia eutropha* ในการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ

ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* โดยใช้กรดคาร์บอกซิลิกที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์ม โดยจะทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงทั้งแบบกะและแบบกึ่งกะ จากนั้นนำ PHA ที่ผลิตได้มาทำการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้น

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

Polyhydroxyalkanoates (PHA) ซึ่งได้แก่ poly -3- hydroxybutyrate (PHB) และ poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิโพรพีรีน และมีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (biocompatible) ซึ่งในขณะนี้มีการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ รวมทั้งยังมีความสามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ ดังนั้น ประโยชน์ของสารกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ได้อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมพลาสติก บรรจุภัณฑ์ อุตสาหกรรมยา การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ เป็นต้น (Jogdand, 2004) ดังนั้น การนำเอากรดคาร์บอกซิลิกที่ได้จากการหมักเส้นปาล์มมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสาร PHA จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนในการผลิตสาร PHA เพื่อผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพซึ่งจะช่วยลดปัญหาขยะพลาสติกได้อีกด้วย