บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันประชากรโลกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดของเสียต่างๆขึ้นมากมาย สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาเหล่านี้ขึ้นมา เนื่องจากการใช้ผลิตภัณฑ์พลาสติกซึ่งเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางปิโตรเคมีซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หรือวัสดุกลุ่มที่ย่อยสลายไม่ได้ เช่น พอลิโพรไพลีน (polypropylene) พอลิยูรีเธน (polyurethane) ไตรคลอโรเอทธิลีน (trichloroethylene) ไวนิลคลอไรด์ (vinyl cholride) และเฮกซาคลอโรอีเธน (hexachloroethane) เป็นต้น เนื่องด้วยคุณสมบัติของวัสดุพลาสติกสังเคราะห์เป็นวัสดุที่มีน้ำหนักเบา มีความคงทนแข็งแรง สามารถปรับแต่งให้มีลักษณะตามต้องการได้ ทำให้ความนิยมในการนำพลาสติกมาใช้งานต่างๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง พลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาของการเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากชุมชน รวมถึงตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรงรวมถึงส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ดังนั้น เพื่อขจัดปัญหาของพลาสติกสังเคราะห์ที่เป็นมลพิษของโลก ดังกล่าวจึงได้มีแนวความคิดที่จะผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ หรือสลายตัวไปได้โดยวิธีการตามธรรมชาติ โดยได้มีการคิดค้นวัสดุใหม่ๆ ที่สามารถกำจัดได้ง่ายรวมถึงออกแบบวิธีการในการเปลี่ยนแปลงวัสดุดังกล่าวให้สามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น

สารชีวภาพ (biomaterial) เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้น ไม่ว่าจะเป็น พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ เป็นอีกทางเลือกสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารย่อยสลายง่าย โดยมีแนวโน้มในการผลิตสารชีวภาพจากจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบหลายอย่าง รวมทั้งสารชีวภาพดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างของสารชีวภาพได้แก่ พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB, พอลิแลคไทด์ (Polylactide), พอลิแซคคาไรด์ ซึ่งล้วนเป็นสารชีวภาพที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาใช้ประโยชน์แทนที่พลาสติกที่สังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี ซึ่งใช้เวลานานในการย่อยสลาย อย่างไรก็ตามการผลิตพลาสติกชีวภาพมีต้นทุนการผลิตสูงกว่าถึง 10 เท่า จึงมีความพยายามในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพลาสติกจากจุลินทรีย์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพ การหาแหล่งวัตถุดิบราคาถูก เป็นต้น

พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB เป็น biomaterial ชนิดหนึ่งในกลุ่ม polyester ซึ่งเป็นกลุ่มไขมันที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ จัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทแอลิฟาทิก-พอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่งในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียมีความสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ จุลินทรีย์จะมีการสังเคราะห์และสะสม PHB ในปริมาณมากหลังการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว และจุลินทรีย์อยู่ภายใต้ภาวะการเจริญที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือในสภาวะปกติที่มีสารอาหารต่างๆเพียงพอต่อการเจริญเติบโตจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารเหล่านั้นเพื่อการสังเคราะห์โปรตีน ไขมัน และสารชีวภาพอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ แต่เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะของการจำกัดสารอาหารบางชนิดที่จำเป็น ได้แก่ ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ออกซิเจน ฟอสฟอรัส หรือโพแทสเซียม จึงมีการสะสม PHB (Lee *et al.*, 1999) เมื่อทำการพิจารณาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าถ้าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน (C:N ratio) มีค่าสูง จะเป็นสาเหตุทำให้จุลินทรีย์เกิดการสังเคราะห์และสะสม PHB หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ จึงเกิดการสะสมสารพลังงานเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปพอลิเมอร์ รวมถึงเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยจุลินทรีย์จะสะสมสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์ในลักษณะของเม็ดแกรนูล (granule) สีขาว คุณสมบัติที่โดดเด่นของ PHB ได้แก่ เป็นพลาสติกสังเคราะห์ชนิดที่ยืดหยุ่นได้เมื่อได้รับความร้อน ซึ่งส่งผลต่อการขึ้นรูปและการนำไปประยุกต์ใช้ ลักษณะรูปทรงผลึก โดยโครงสร้างภายในเป็นผลึกเพียงบางส่วนและสามารถเกิดผลึกได้ 55-75 % โดยเฉพาะจาก side chain ที่ไม่อิ่มตัว ทำให้มีโครงสร้างที่ไม่แน่นอน คุณสมบัติทางกลศาสตร์ซึ่งคล้ายกับสารสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ เช่น พอลิโพรไพลีน ความสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) และความสามารถในการเข้ากันได้กับเซลล์ หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (biocompatible) ซึ่งพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมีคุณสมบัติทางกายภาพเช่นเดียวกันกับเทอร์โมพลาสติกจึงสามารถนำมาทำเป็นฟิล์มห่อของ ไฟเบอร์ หรือนำมาหลอมเป็นภาชนะต่างๆได้ นอกจากนี้พลาสติกดังกล่าวยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้อีกด้วย เช่น นำมาผลิตไหมละลาย เส้นเลือดเทียม (blood vessels replacements) กระดูกเทียมและแผ่นติดฟันปลอม (bone replacememts and plates) เป็นต้น จุลินทรีย์ที่สามารถทำการสังเคราะห์รวมถึงมีการสะสมสาร PHB นั้นมากกว่า 20 ชนิด ได้แก่ *Alcaligenes* sp. , *Azotobacter* sp. , *Pseudomonas* sp. , *Methylobacterium* sp. , *Bacillus* sp. , *Chromobacterium* sp. , *Hyphomicrobium* sp. , *Rhodospirillium* sp. , *Streptomyces* sp. และ *Rhodobacter* sp. (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และหยาดฝน มหาทรัพย์ไพบูลย์. 2543) ดังนั้น พลาสติกชีวภาพนี้จึงได้รับความสนใจมากในการนำมาใช้ประโยชน์แทนที่พลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี จึงมีความพยายามที่จะลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลงด้วยการศึกษาสายพันธุ์

หรือปรับปรุงสายพันธุ์ให้สามารถผลิตพอลิเมอร์นี้ได้เพิ่มขึ้น รวมทั้งศึกษาปัจจัยด้านอาหาร และสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเลี้ยง การพัฒนาการหมัก ได้แก่ การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง การหมักแบบไม่ต่อเนื่องสองขั้นตอน กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง การหมักแบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว และการหมักแบบต่อเนื่องสองขั้นตอน เป็นต้น ตลอดจนการนำวัตถุดิบที่หาง่ายและราคาถูกมาผลิต

บทตรวจเอกสาร

1. Poly-β-hydroxybutyrate หรือ PHB

พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยเป็นพอลิเอสเทอร์ประเภท แอลิฟาทิก-พอลิเอสเทอร์ และเป็นสารประเภทกลุ่มไขมันที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ ซึ่งจุลินทรย์โดยเฉพาะแบคทีเรียมีความสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ จุลินทรีย์จะมีการสังเคราะห์และสะสม PHB ในปริมาณมากหลังการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว และจุลินทรีย์อยู่ภายใต้ภาวะการเจริญที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือ ในสภาวะปกติที่มีสารอาหารต่างๆ เพียงพอต่อการเจริญเติบโต จุลินทรีย์จะใช้สารอาหารเหล่านั้นเพื่อการสังเคราะห์โปรตีน ไขมัน และสารชีวภาพอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ แต่เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในภาวะของการจำกัดสารอาหารบางชนิดที่จำเป็น ได้แก่ ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ออกซิเจน ฟอสฟอรัส หรือโพแทสเซียม จึงมีการสะสม PHB (Lee *et al.*, 1999) เมื่อทำการพิจารณาแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนพบว่าถ้าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน (C:N ratio) มีค่าสูง จะเป็นสาเหตุทำให้จุลินทรีย์เกิดการสังเคราะห์และสะสมสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ จึงเกิดการสะสมสารพลังงานเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปพอลิเมอร์ รวมถึงเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยจุลินทรีย์จะสะสมสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์ ซึ่งมีลักษณะของเม็ดแกรนูล (granule) สีขาว จุลินทรีย์ที่พบว่ามีความสามารถในการผลิตนั้นมีมากถึง 90 สายพันธุ์ ซึ่งมีทั้งกลุ่ม Aerobe, Anaerobe, แบคทีเรียสังเคราะห์แสง และ Archaebacteria (Luengo *et al.,* 2003) และคุณสมบัติที่โดดเด่นของ PHB ได้แก่

- เป็นพลาสติกสังเคราะห์ชนิดที่ยืดหยุ่นได้เมื่อได้รับความร้อน ซึ่งส่งผลต่อการขึ้นรูปและการนำไปประยุกต์ใช้
- ลักษณะรูปทรงผลึก โดยโครงสร้างภายในเป็นผลึกเพียงบางส่วนและสามารถเกิดผลึกได้ 55-75 % โดยเฉพาะจาก side chain ที่ไม่อิ่มตัว ทำให้มีโครงสร้างที่ไม่แน่นอน

- คุณสมบัติทางกลศาสตร์ซึ่งคล้ายกับสารสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ เช่น พอลิโพรไพลีน
- ความสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable)
- ความสามารถในการเข้ากันได้กับเซลล์ หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (biocompatible)

จากการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ พบว่าสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทนและไดคลอโรอะซีเทต เป็นต้น แต่ PHB ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารละลายมีขั้ว ตัวอย่างเช่น น้ำ เมทานอล เอทานอล สำหรับความหนาแน่นของ PHB จะอยู่ระหว่าง1.171-1.260 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร PHB ที่มีความหนาแน่นต่ำจะมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน แต่ถ้าหากมีความหนาแน่นสูงจะสามารถตกผลึกได้ ส่วนจุดหลอมเหลวจะแปรผันระหว่าง 157-188 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเห็นได้ว่าคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเหล่านี้ใกล้เคียงกับพอลิโพรไพลีนซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์

สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นสารประกอบพอลิเอสเทอร์ในกลุ่มของพอลิเบต้าไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHA) ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น โดยมีองค์ประกอบของโครงสร้างอยู่ในรูป R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R-(β)-hydroxy fatty acid โดยมีโครงสร้างทางเคมีโดยทั่วไปดังภาพที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อสารประกอบตั้งต้นหรือหน่วยย่อยมีหมู่ R เป็น methyl จะได้สารประกอบพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอนิล ออกซิเจน และหมู่เมทิล โดยที่มอนอเมอร์จะต่อกันเป็นสาย PHB ด้วยพันธะเอสเทอร์ จำนวนมอนอเมอร์ที่ประกอบเป็นสายมีประมาณ 23,000-35,000 ซึ่งความยาวของพอลิเมอร์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆดังนี้ วิธีสกัด PHB ออกจากเซลล์ ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ผลิต ชนิดของสารตั้งต้น ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ชนิดของสารอาหารที่จำกัดต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ ตลอดจนภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงระหว่างการผลิต (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และหยาดฝน มหาทรัพย์ไพบูลย์. 2543)

1. การแบ่งกลุ่มของสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ประกอบด้วยหน่วยย่อยของมอนอเมอร์รวมกันเกิดเป็นสายพอลิเมอร์ยาว หรือสั้นขึ้นกับจำนวนมอนอเมอร์ที่มาต่อรวมกัน ซึ่งสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสามารถแบ่งออกได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์ ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

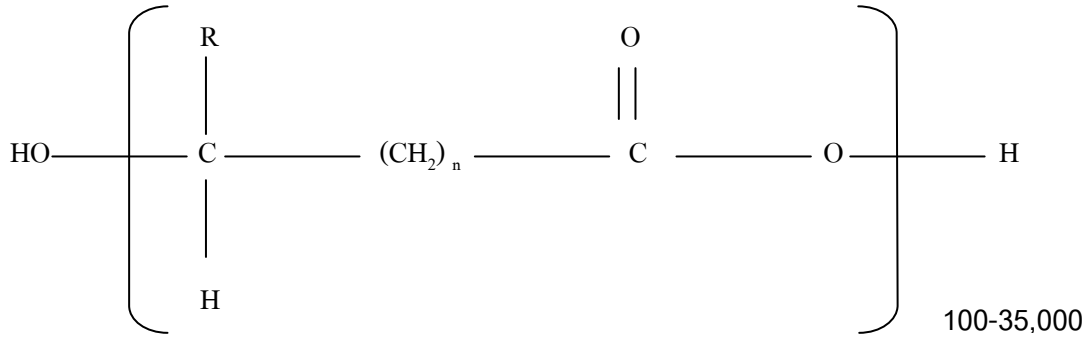
1.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer)

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของพอลิเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกัน ซึ่งในกรณีนี้เป็นการเชื่อมต่อกันของ R-(β)-hydroxy fatty acid ชนิด β-hydroxybutyrate

ซึ่งมีหมู่เมธิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมอนอเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยให้คุณสมบัติคล้ายพอลิเมอร์สังเคราะห์อย่างพอลิโพรไพลีน พบว่า *Alcaligenes latus* มีความสามารถในการผลิตสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ดีในการเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed-batch) ซึ่งให้ปริมาณ PHB มากกว่าการเลี้ยงแบบกะ (batch) ถึง 8 เท่า (Grothe and Chisti, 2000)

1.2 โคพอลิเมอร์ (copolymer)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อยของพอลิเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน ในกรณีโคพอลิเมอร์ของสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต นอกจากมอนอเมอร์ที่เป็นβ-hydroxybutyrate จะมีการเชื่อมต่อกับมอนอเมอร์อื่นเช่นกัน เช่น P (3HB-co-3HV) หรือเรียกว่า poly (3-hydroxybutyrate-copolymer-3-hydroxyvalerate) ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* และจากการศึกษาของ Chen และคณะ (2001) ได้พบว่า *Aeromonas hydrophila* 4AK4 สามารถผลิต P(3HB-co-3HHx) หรือ poly(3-hydroxybutyrate-copolymer-3-hydroxyhexanoate) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมีกรดลอริก (lauric acid) เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมภายใต้สภาวะการจำกัดไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัส รวมถึงพบว่า *Escherichia coli* สายพันธุ์กลายสามารถผลิต P(3HB-co-HV) หรือ poly(3-hydroxybutyrate-copolymer-3-hydroxyvalerate) โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนร่วมกันระหว่างกลูโคสกับกรดโพรพิโอนิค (Lee *et al.*, 1995)



n	R	Polymer
n=1	R= methy	Poly-3-hydroxybutyrate
	R= ethyl	Poly-3-hydroxyvalerate
	R= propyl	Poly-3-hydroxycaproate
	R= butyl	Poly-3-hydroxyheptanoate
	R= pentyl	Poly-3-hydroxyoctanoate
	R= hexyl	Poly-3-hydroxynonanoate
	R= heptyl	Poly-3-hydroxydecanoate
	R= octyl	Poly-3-hydroxyundecanoate
	R= nonyl	Poly-3-hydroxydodeccanoate
	R= hydrogen	Poly-3-hydroxypropionate
n=2	R= hydrogen	Poly-4-hydroxybutyrate
n=3	R= hydrogen	Poly-5-hydroxyvalerate

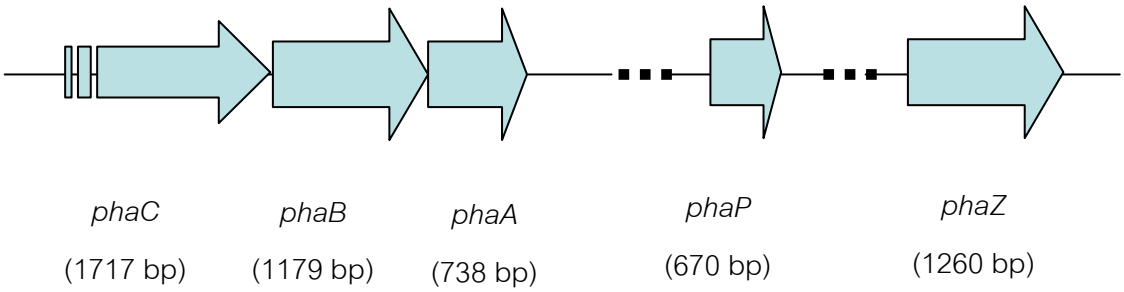
ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิเบต้าไฮดรอกอัลคาโนเอทและการเรียกชื่อ

Figure 1. The general PHA structure and name achievement.

ที่มา : ดัดแปลง Doi (1990); Lee (1996)

2. การสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและโคพอลิเมอร์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

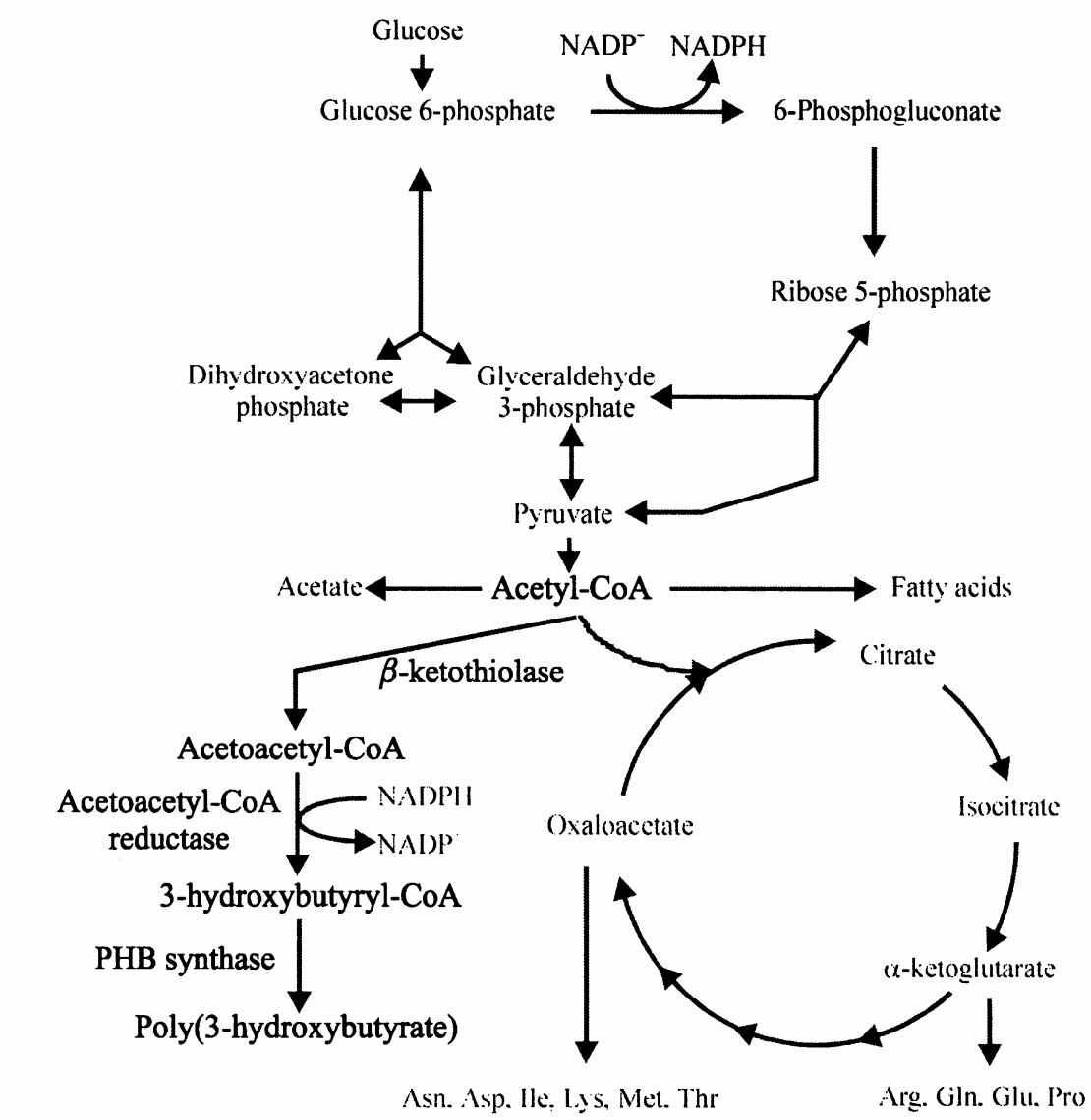
วิถีการสังเคราะห์สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยเริ่มต้นจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ (Hydroxylbutyryl-CoA) ด้วยการทำงานของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-coA reductase) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) ของไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB ซินทิเทส (PHB synthetase) อย่างไรก็ตาม PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส (hydroxybutyrate dehydrogenase) เมื่อพิจารณา PHB ภายในเซลล์พบว่ามีลักษณะเป็น granule โดยมี monolayer phospholipid membrane ห่อหุ้มอยู่โดยอาจพบว่ามีโปรตีนบางชนิดสำหรับสังเคราะห์และย่อยสลายแทรกกระจายสอดแทรกอยู่โดยรอบ และการควบคุมผลิต PHB นั้นพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ *phaCBA* cluster ซึ่งจะประกอบด้วย *phaA*, *phaB* และ *phaC* โดย *phaA* เป็นส่วนที่ควบคุมสำหรับการผลิต β-ketothiolase โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลง acetyl-coA ไปเป็น acetoacetyl-coA สำหรับ *phaB* เป็นส่วนที่ควบคุมการผลิตหรือสร้างเอนไซม์ NADPH-oxidoreductase ซึ่งจะทำการเปลี่ยน acetoacetyl-coA ให้เป็น R-3-hydroxybutyryl-coA และสำหรับ *phaC* เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ PHB polymerase โดยจะทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์จากมอนอเมอร์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน acetoacetyl-coA นั่นคือ R-3-hydroxybutyryl-coA สำหรับลักษณะของ *phaCBA* cluster แสดงดังภาพที่ 2 และวิถีการสังเคราะห์สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 ลักษณะของ *phaCBA* cluster

Figure 2. *phaCBA* cluster of key enzyme for PHA biosynthesis.

ที่มา : Luengo *et al*., 2003



ภาพที่ 3 วิถีการสังเคราะห์สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

Figure 3. The general PHB biosynthesis pathway.

ที่มา : ดัดแปลงจาก Reddy *et al.*, 2003

การควบคุม PHB จะค่อนข้างซับซ้อน และการที่มี acetyl-coA มากเกินพอจะส่งผลให้การสังเคราะห์สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตลดลง รวมถึงการมีสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมก็เป็นสาเหตุของการผลิต PHB เช่นกัน อย่างในกรณีของ *Bacillus megaterium* พบว่า *phaC* มีการผลิตเอนไซม์รูปที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ (inactive enzyme) ซึ่งต้องอาศัยโปรตีนบางชนิดกระตุ้นให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่พร้อมสำหรับเร่งปฏิกิริยา (functional enzyme) เมื่อพิจารณาบน *phaCBA* cluster พบว่ามีส่วนที่เป็น *phaZ* และ *phaP* ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตโปรตีนที่มีหน้าที่ต่างกัน โดย *phaZ* ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย (catabolism) นั่นคือผลิตเอนไซม์ depolymerase เพื่อใช้เร่งการปลดปล่อย R-3-hydroxybutyrate จากพอลิเมอร์หรือโอลิโกเมอร์ เมื่อมีการขาดไฮดรอกซีบิวทีเรต พบว่า *phaZ* จะทำการผลิต depolymerase ออกมาในภาพที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ ซึ่งต้องอาศัย PHB หรือ ตัวกระตุ้น (activator) เช่น trypsin เป็นตัวเปลี่ยนให้ depolymerase อยู่ในรูปที่พร้อมสำหรับเร่งปฏิกิริยา ทำให้มีข้อสังเกตุว่า *phaZ* จะผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปของ proenzyme ในขณะเดียวกันการสลาย PHB granule จำเป็นต้องอาศัย proteolytic enzyme ร่วมเช่นกัน มีการคาดว่า depolymerase น่าจะทำงานร่วมกับเอนไซม์อีกหลายชนิด (Luengo *et al*., 2003)

ส่วน *phaP* ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของ PHB granule นั่นคือโปรตีน phasin ซึ่งเป็น low-molecular weight protein โดยมีการสะสมเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ PHB และมีหน้าที่ส่งเสริมการผลิต PHB ด้วยการเชื่อมกับ granule เพื่อทำการควบคุมขนาด จำนวน และพื้นผิวของ PHB inclusion การสังเคราะห์และการสะสม phasin เป็นกลไกที่เกิดขึ้นร่วมกับ *phaR* ซึ่งเป็น autoregulated repressor อย่างไรก็ตาม การควบคุมขนาดและจำนวนของ PHB inclusion ไม่เกี่ยวข้องเฉพาะ *phaP* แต่ยังขึ้นกับปริมาณของ *phaC* ที่มีอยู่ในเซลล์ ดังนั้นในกรณีของแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการตัดแต่งพันธุกรรมโดยให้มี polymerase มากมีผลให้การสังเคราะห์ PHB เกิดขึ้นในลักษณะเป็นพอลิเมอร์ หรือ inclusion ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ในทางกลับกันถ้ามี polymerase น้อย การเกิด PHB inclusion มีไม่มาก แต่จะเป็น inclusion ที่มีขนาดใหญ่ หรือ พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Luengo *et al*., 2003)

PHB ถูกสะสมภายใน granule ซึ่งมีขนาดต่างๆกัน โดยถูกล้อมรอบด้วย phospholipid monolayer และ phasin รวมถึงเอนไซม์ polymerase และ depolymerase และ unknown protein สำหรับหน้าที่ของ phospholipid envelope คาดว่าเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับน้ำเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงจาก amorphous lipid state ไปเป็น crystalline form และแสดงให้เห็นถึงหน้าที่ในการเป็น protective barrier ป้องกันตัวเซลล์ถูกทำลายจากการมีปฏิสัมพันธ์กับ PHB และโครงสร้างอื่นๆรวมถึง cytosic protein (unknown protein) ถ้า phospholipid monolayer มีความจำเป็นต่อการ

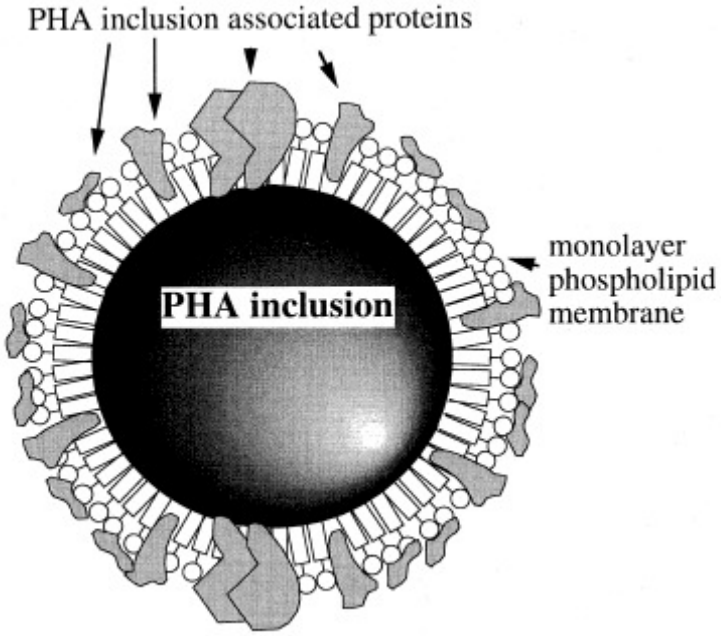
ป้องกันตัวเซลล์จากกระบวนการสร้าง PHB ในช่วงเริ่มต้นแล้ว สามารถตั้งข้อสังเกตได้ว่า envelope ที่เกิดขึ้นจะถูกเพิ่มขึ้นรอบๆ PHB granule เท่ากับขนาดของ PHB granule ดังนั้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ phospholipid monolayer ก็ย่อมมีส่วนร่วมกับเอนไซม์ polymerase ซึ่งลักษณะ PHA granule ภายในเซลล์แสดงดังภาพที่ 4

สำหรับกระบวนการเกิดโคพอลิเมอร์ของ PHB เช่น PHBV ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 5 และกระบวนการเกิดดังภาพที่ 6 สามารถเกิดขึ้นได้ด้วยการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดหน่วยย่อย 2 ชนิดต่างกัน คือ β-hydroxybutyrate และ β-hydroxyvalerate ในการเกิดโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV นั้นจำเป็นต้องอาศัยสารตัวกลางที่สำคัญคือ Propionyl-CoA โดยการผลิต Propionyl-CoA สามารถทำได้โดยการเติมกรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริก หรือกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้นๆที่มีจำนวนคาร์บอนเลขคี่ จากภายนอก (ดังภาพที่ 5) รวมถึงสามารถใช้กรดอะมิโนตัวอื่นได้เช่นกัน ซึ่งกรดอะมิโนที่สามารถเป็นสารตั้งต้นได้นั้น เช่น isoleucine, valine, methionine และ threonine

isoleucine, valine และ methionine ต้องผ่านกระบวนการสลาย (catabolic step) หลายขั้นตอนในการเกิดเป็น Propionyl-CoA ซึ่งในทางตรงกันข้ามกับ threonine ที่เกิดเพียง 2 ขั้นตอนใหญ่ โดยกระบวนการสังเคราะห์เกิดขึ้นดังนี้

- กระบวนการ Deamination ซึ่งเป็นการดึงหมู่อะมิโนออกจากโครงสร้างของ threonine โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ threonine dehydratase (TD, EC 4.2.1.16) เพื่อเปลี่ยน threonine ให้เกิดเป็น α-ketobutyric acid (α-KB)

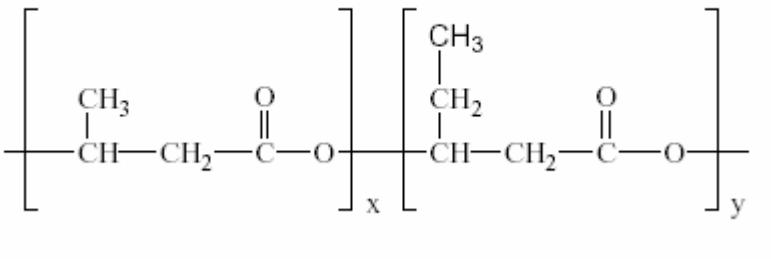
- กระบวนการเกิด Propionyl-CoA ในขั้นตอนนี้ต้องอาศัยกลุ่มเอนไซม์ในการเปลี่ยน α-ketobutyric acid มาเป็น Propionyl-CoA ซึ่งกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวเรียกว่า α-ketoacid oxidative decarboxylase enzyme complexes อันประกอบด้วย branced-chain α-ketoacid oxidative dehydrogenase complex (BCKD), α-ketoglutarate dehydrogenase complex (KGD) และ pyruvate dehydrogenase complex (PD) ซึ่งจะเป็นตัวเร่งกระบวนการการกำจัดหมู่คาร์บอกซิลจาก α-ketoacid และทำให้เกิดพันธะ thioester bond ระหว่าง CoA อิสระกับหมู่ ketoacyl ของ α-ketoacid วิถีการผลิต Propionyl-CoA จากกรดอะมิโน threonine แสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 4 ลักษณะ PHA granule ภายในเซลล์

Figure 4. PHA inclusion coated by monolayer phospholipids membrane.

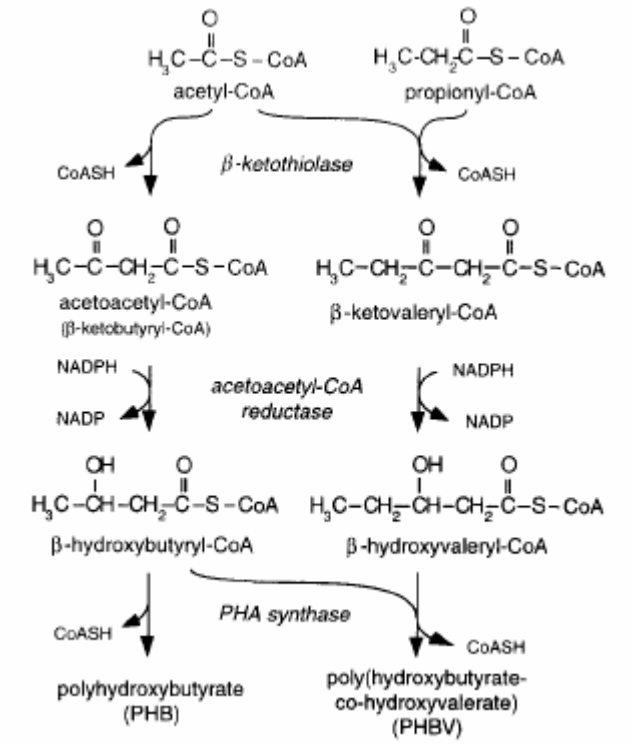
ที่มา : Sudesh *et al.*, (2000)



ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

Figure 5. The general chemical structure of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).

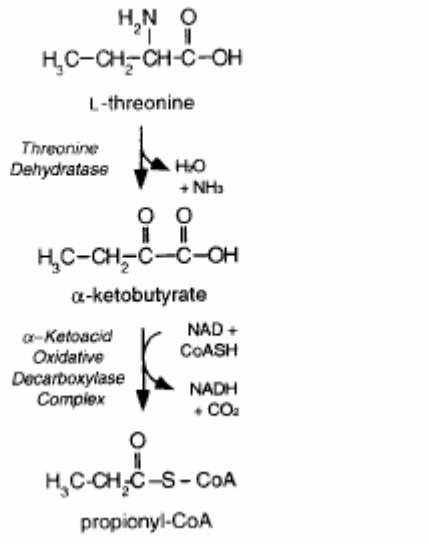
ที่มา : Lenz and Marchessault (2003)



ภาพที่ 6 วิถีการสังเคราะห์ PHB และ PHBV

Figure 6. The relationship pathway of PHB and PHBV biosynthesis.

ที่มา : Eschenlauer *et al.*, 1996



ภาพที่ 7 วิถีการผลิต Propionyl-CoA จากกรดอะมิโน threonine

Figure 7. The achievement of propinyl-CoA from L-threonine.

ที่มา : Eschenlauer *et al.,* 1996

3. คุณลักษณะทางกายภาพของพอลิเมอร์กลุ่ม PHA

พอลิเมอร์ในกลุ่มของ PHA จัดเป็น thermoplastic เนื่องจากมีคุณสมบัติบางประการเช่น ความเหนียว หรือ อุณหภูมิหลอมเหลวเทียบเคียงได้กับพอลิเมอร์สังเคราะห์ หรือพอลิเมอร์จากกระบวนการทางปิโตรเคมี อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์ กับโคพอลิเมอร์พบว่าพอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์มีความเปราะ หรือมีความยืดหยุ่นต่ำกว่าพอลิเมอร์ชนิดโคพอลิเมอร์ (Hocking and Marchessault, 1994) จึงมีความสนใจในการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์อย่างต่อเนื่อง รวมถึงมีการพัฒนาชนิดของโคพอลิเมอร์เพื่อให้มีศักยภาพที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงเป็นพลาสติกทดแทน อย่างไรก็ตามการพัฒนาชนิดโคพอลิเมอร์จำเป็นต้องขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพ ควรมีคุณสมบัติเบื้องต้นใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ ซึ่งสามารถสรุปคุณสมบัติเบื้องต้นดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ PHBV และพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

Table 1. Physical property of PHBV and other polymer.

Polymer	Melting point (° C)	Young's modulus (GPA)	Tensile strength (Mpa)	Elongation to break (%)	Notched Izod impact strength (J m^{-1})
P (3HB)	179	3.5	40	5	50
P (3HB-co-3HV)[a]					
3 mol % 3HV	170	2.9	38	-[b]	60
9 mol % 3HV	162	1.9	37	-	95
14 mol% 3HV	150	1.5	35	-	120
20 mol% 3HV	145	1.2	32	-	200
25 mol% 3HV	137	0.7	30	-	400
P (3HB-co-4HB)[c]					
3 mol % 4HB	166	-	28	45	-
10 mol% 4HB	159	-	24	242	-
16 mol % 4HB	-	-	26	444	-
64 mol % 4HB	50	30	17	591	-
90 mol % 4HB	50	100	65	1080	-
P (4HB)[d]	53	149	104	1000	-
P (3HHx-co3HO)[e]	61	-	10	300	-
Polypropylene	170	1.7	34.5	400	45
Polyethylene Terephthalate	262	2.2	56	7300	3400
Polystyrene	110	3.1	50	-	21

[a] Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [b] Data not available

[c] Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [d] Poly(4-hydroxybutyrate)

[e] Poly (3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate)

ที่มา : Hocking and Marchessault (1994)

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB

4.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ในการผลิตสาร PHB ก็จะมีผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย กล่าวคือบางสายพันธุ์ของจุลินทรีย์อาจผลิตพอลิเมอร์ออกมาในรูปโฮโมพอลิเมอร์ ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์อีกชนิดอาจมีการผลิตพอลิเมอร์ในลักษณะของโคพอลิเมอร์ เช่นเมื่อให้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่ *A. eutrophus* R_3 พบว่ามีการผลิตสารพอลิเมอร์ในรูป P(3HB-co-3HV) แต่เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนเดิมให้แก่ *A. eutrophus* ATCC17697 พบว่ามีการผลิต PHB กลับไม่พบการผลิตโคพอลิเมอร์ นอกจากนี้พบว่าการที่จุลินทรีย์ผลิตโคพอลิเมอร์ได้ดี เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดร่วมกันเป็นสับสเตรท

Li และคณะ (1999) ผลิตสาร PHB จากการใช้ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 โดยเลี้ยงในสภาวะที่ทำการควบคุมต่างกันออกไป ซึ่งพบว่าในสภาวะที่เป็น O_2 inhibition และ P inhibition มีการชักนำให้มีการผลิต PHB และ PHB ที่ผลิตได้มีความเข้มข้น 111.8 g/l และ PHB content สูงถึง 80.9 %

Breuer และ Babel (1999) รายงานว่าหลังจากการทำการกลายพันธ์ *Methylobacterium rhodesianum* พบว่าเชื้อมีความสามารถในการผลิต PHB โดยจะมีการผลิตเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในภายใต้สภาวะที่ถูกจำกัด รวมถึงสามารถผลิตพอลิเมอร์อื่นๆนอกจาก PHB เช่นกัน ในขณะที่ Yellore และ Desai (1998) สามารถคัดแยกเชื้อ *Methylobacterium* sp. ZP24 และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถผลิต PHB ได้ 59% ของน้ำหนักแห้งหลังการเลี้ยงเชื้อ 40 ชั่วโมง แต่เมื่อมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อผลิต PHB ได้มากขึ้นประมาณ 5 เท่า

Bormann และ Roth (1999) ทำการผลิต PHB จาก *Methylobacterium rhodesianum* กับ *Ralstonia eutropha* ในอาหารเคซีนไฮโดรไลเซตซึ่งมีการเติมกลีเซอรอล พบว่า *Methylobacterium rhodesianum* สามารถผลิต PHB ได้ 39 % โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงประมาณ 92 ชั่วโมง จากการเลี้ยงในฟลาสก์ แต่เมื่อทำการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์พบว่าที่เวลา 45 ชั่วโมงเชื้อให้ PHB สูงถึง 50 % ในขณะที่ *Ralstonia eutropha* สามารถผลิตได้ 47 % หลังการเลี้ยงประมาณ 67 ชั่วโมง ในฟลาสก์ จากการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่เวลา 45 ชั่วโมงสูงถึง 65%

มีรายงานการผลิต PHB ด้วย recombinant *Escherichia coli* สายพันธุ์ HNS174/pTZ18u-PHB โดยใช้ beet molasses เป็นแหล่งพลังงาน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ 39.5 g/l ในขณะที่ปริมาณ PHB สูงถึง 80 % PHB productivity มีค่าเท่ากับ 1 g/l (Fang *et al*., 1998)

ในขณะที่ recombinant *Escherichia coli* สายพันธุ์ CGSC 4401 สามารถผลิต PHB ได้168 g/l มีค่า PHB content สูงถึง 87 % และมีค่า PHB productivity เท่ากับ 4.6 g PHB/l/h (Ahn *et al*., 2001)

นอกจากนี้มีรายงานว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก สามารถผลิต PHB เมื่อเลี้ยงเชื้อใน MRS broth และ Elliker broth โดย *Lactobacillus* sp. สามารถผลิตได้ 6.6-35.8% เมื่อเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่ *Lactococcus* sp., *Pediococcus* sp., และ *Streptococcus* sp. สามารถผลิตได้ 9.0-20.9, 1.1-8.0 และ6.8-17.2 % ตามลำดับ แสดงดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในสกุล *Lactococcus* sp., *Pediococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. ที่ผลิต PHB

Table 2. PHB production from lactic acid bacterial strain of *Lactococcus* sp., *Pediococcus* sp.and *Streptococcus* sp.

Bacteria	Cell dry weight (g l^{-1})	PHB[a] (g l^{-1})	Yield of PHB[b] (%)
L. lactis A1	2.30 ± 0.34	0.48 ± 0.03	20.9
L. lactis subsp.*diacetylactis* A2	0.96 ± 0.00	0.01 ± 0.00	9.1
L. cremoris A3	2.78 ± 0.30	0.51 ± 0.04	18.5
P. halophilus B1	2.66 ± 0.12	0.11 ± 0.03	5.4
P. halophilus B2	2.62 ± 0.50	0.02 ± 0.02	1.1
P. halophilus B3	2.37 ± 0.01	0.12 ± 0.04	5.1
P. halophilus B4	1.80 ± 0.16	0.08 ± 0.07	4.9
P. halophilus B5	1.97 ± 0.19	0.15 ± 0.07	7.7
P. halophilus B6	2.98 ± 0.30	0.24 ± 0.17	8.0
S. thermophilus E1	1.11 ± 0.25	0.19 ± 0.04	17.2
S. thermophilus E2	1.30 ± 0.22	0.13 ± 0.02	10.4
S. thermophilus E3	1.41 ± 0.21	0.09 ± 0.01	6.8
S. thermophilus E4	0.62 ± 0.06	0.10 ± 0.01	16.6

[a]Determined at cell dry weight.
[b]According to cell dry weight.

ที่มา : Aslim *et al*., 1998

จะเห็นว่าจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีโครงสร้างของยีน และวิถีการสังเคราะห์พอลิเมอร์แตกต่างกัน มีผลให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกัน ดังนั้นในการผลิตพอลิเมอร์ PHB จึงควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการผลิตที่สูง

4.2 แหล่งอาหาร

4.2.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการผลิต PHB กระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHB จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดและภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือเมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอแต่มีการจำกัดปัจจัยบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน หรือฟอสฟอรัส เป็นต้น ดังนั้นในการผลิตจึงต้องศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจึงจะทำให้การผลิตเกิดขึ้นได้ดีสำหรับการผลิต PHB ในรูปโคพอลิเมอร์ นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต และจำเป็นต้องคำนึงถึงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ด้วย การสังเคราะห์โคพอลิเมอร์นิยมใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดรวมกัน คาร์บอนแต่ละชนิดที่ใช้มีผลต่อองค์ประกอบของโคพอลิเมอร์

Taidi และคณะ (1994) พบว่าขนาดของ PHB ที่เกิดขึ้นและสะสมภายในเซลล์ของ *Methylobacterium extorquens* NCIMB 9133 มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเมธานอล หรือ โซเดียมซัคซิเนต ความเข้มข้น 4 g/l PHB ที่เชื้อผลิตขึ้นมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากสุด เท่ากับ $0.6 \times 10^{-6} - 1.7 \times 10^{-6}$

Yellore และคณะ (1999) พบว่า PHB จาก *Methylobacterium* sp. ZP24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมซูโครส ในระหว่างการเจริญของเชื้อรวมถึงการผลิตสาร PHB พบว่าการผลิตสาร PHB เพิ่มขึ้นเมื่อทำควบคุมให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอร์เมทและกรดอินทรย์อื่นๆ ให้มีในปริมาณที่ต่ำประมาณ 10 mmol/l มีผลให้การผลิตสาร PHB เพิ่มขึ้น 2-4 เท่าและลดเวลาในการผลิตลงเหลือเพียง 12 ชั่วโมง

Bormann และ Roth (1999) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Methyllobacterium rhodesianum* และ *Ralstonia eutropha* เพื่อใช้ผลิตสาร PHB โดยทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีการเติม glycerol สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Methylobacterium rhodesianum* สามารถผลิตสาร PHB ได้ภายในระยะเวลา 92 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตได้ 39 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเป็นการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ เมื่อทำการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์พบว่าสามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นเป็น 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้งและใช้เวลาน้อยลงเพียง 45 ชั่วโมง สำหรับ *Ralstonia eutropha* พบว่าการผลิต PHB เกิดขึ้น 47 % ภายใน 67 ชั่วโมง ซึ่งจำเป็นต้องมีการเติม casein peptone แต่เมื่อมีการเติม casamino acids สามารถผลิต PHB ได้ภายใน 45 ชั่วโมงซึ่งผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 65 %ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Boom และคณะ (1999) พบว่า *Alcaligenes eutrophus* NCIM 11599 สามารถผลิต PHB ซึ่งการลี้ยงเชื้อเป็นแบบกึ่งกะด้วยการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของ

น้ำตาลกลูโคสให้ได้ระดับที่ 10-20 g/l ร่วมกับการควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้มีอย่างจำกัด ซึ่งพบว่าสามารถส่งเสริมการผลิต PHB ได้โดย PHB content ที่ได้ประมาณ 76 %ของน้ำหนักแห้ง

Quagliano และ Miyazaki (1999) PHB และ exopolysaccharides (EPS) จากเชื้อ *Azotobacter chroococcum* 6B ด้วยการใช้แหล่งคาร์บอนในรูป complex carbon source โดยเลี้ยงเชื้อในกากน้ำตาลจากอ้อย พบว่าเกิดการผลิต PHB และ ESP ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณ PHB ที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.75 g/l คิดเป็น PHB content เท่ากับ 37 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

เนื่องจากกระบวนการผลิตสาร PHB มีค่าใช้จ่ายหรือต้นทุนสูง จึงมีแนวคิดที่จะพยายามลดค่าใช้จ่ายด้วยการใช้วัสดุเศษเหลือ รวมถึงสับสเตรทราคาถูก ในการผลิตสาร PHB ด้วยจุลินทรีย์ มีการผลิต PHB โดยเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter chroococcum* H23 ในอาหาร alpechin medium ซึ่ง alpechin เป็นน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันมะกอก พบว่าหลังการบ่มเพียง 24 ชั่วโมงเชื้อสามารถเจริญได้ดีและสามารถผลิตสาร PHB ได้ถึง 50% ของน้ำหนักแห้งโดยในอาหาร alpechin medium จำเป็นต้องมีการเติมแอมโมเนียม (NH_4^+) เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งจะช่วยส่งเสริมการผลิต PHB ของเชื้อดังกล่าว (Martinez *et al*.,1995)

Yellore และ Desai (1998) เลี้ยง *Methylobacterium* sp. ZP24 ในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตสในหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ 59% ของน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้เวลาในการผลิต 40 ชั่วโมง

Ribera และ คณะ (2001) ผลิต PHB จาก *Pseudomonas putida* KT2442 ที่มีพลาสมิด pSK2665 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ได้จากการปรับแต่งพันธุกรรม โดยเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันมะกอกหรือเรียกอีกอย่างว่า alpechin ซึ่งโดยปกติจะเป็นพิษกับสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่พบว่า *Pseudomonas putida* KT2442 สามารถใช้ alpechin สำหรับผลิต PHB ได้ผลผลิตประมาณ 21.25-126.95 mg/l

สำหรับตัวอย่างการใช้สับสเตรทราคาถูกและปริมาณ PHB ที่ได้ รวมถึงวิธีการเลี้ยงสำหรับผลิตแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การผลิตสาร PHB จากจุลินทรีย์โดยใช้สารอาหารราคาถูก

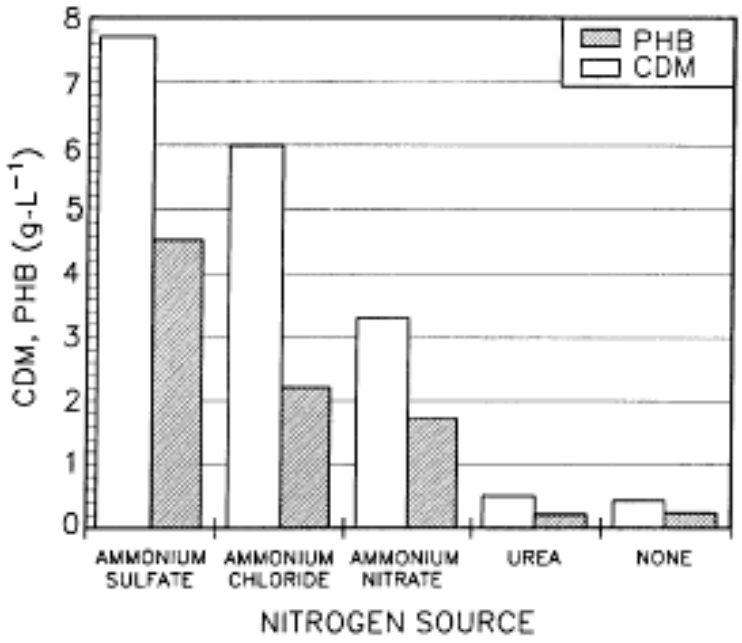
Table 3. PHB production from microorganism using renewable source.

Organism	Carbon source	Culture mode	Culture time (h)	Cell conc. ($g\ l^{-1}$)	PHB conc. ($g\ l^{-1}$)	PHB content (%)	Productivity ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)	Yield (g PHB/g substrate)
Azotobacter chroococcum	Starch	Fed-batch	70	54	25	46	0.35	
Azotobacter chroococcum	Starch	Batch	58	1.17	0.864	73.9	0.0149	0.174
Azotobacter chroococcum H23	Starch	Batch	72	5.19	3.85	74.2	0.0535	
Haloferax mediterranei	Starch	Batch		10	6	60		0.33
Ralstonia eutropha	Tapioca hydrolysate	Fed-batch	59	106	61	58	1.03	
Recombinant *Escherichia coli*	Whey	Fed-batch with oxygen limitation	52	31	25	80	0.48	
Recombinant *Escherichia coli*	Whey	Fed-batch without oxygen limitation	35	55	32	57	0.90	
Methylobacterium sp. ZP24	Whey	Batch	48	9.9	5.9	59.6	0.123	
Pseudomonas cepacia	Lactose	Batch	120	3.57	2	56	0.0167	0.147
Pseudomonas cepacia	Xylose	Batch				48.8		0.11
Pseudomonas cepacia	Xylose	Batch	60	2.59	1.55	60	0.0259	0.11
Pseudomonas pseudoflava	Xylose	Batch				22		0.04
Azotobacter vinelandii UWD	Molasses	Fed-batch	36	33	22	66	0.61	0.29

ที่มา : Kim (2000)

4.2.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน, เคซีนเปบโตน, yeast extract และ corn-steep liqour รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ การเติมเกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) ต่างๆ สำหรับการผลิตสาร PHB พบว่าจะเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอ แต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัด กล่าวคืออัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนมีค่าสูง การเจริญและการผลิต PHB เมื่อแหล่งไนโตรเจนต่างกันของเชื้อ *Alcaligenes latus* ATCC 29713 แสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือแอมโมเนียมที่ต่างกัน เปรียบเทียบกับการใช้ยูเรียและไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลการเจริญและการผลิต PHB ดีที่สุด ในขณะที่การใช้ยูเรีย กับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนให้ผลการเจริญและการผลิต PHB ต่ำมาก แสดงให้เห็นว่ายูเรียไม่เหมาะสมกับการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับเชื้อดังกล่าว



ภาพที่ 8 ปริมาณเซลล์และ PHB ที่ผลิตได้ เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกันของเชื้อ *Alcaligenes latus*, ATCC 29713

Figure 8. The effect of nitrogen soures for PHB production from *Alcaligenes latus*, ATCC 29713.

ที่มา : Grothe *et al.,* 1999

Bitar และ Underhill (1990) พบว่า *Alcaligenes eutrophus* H16 มีการสะสม PHB ไว้ภายในเซลล์ เมื่อทำการควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เอื้ออำนวยต่อการผลิต การสังเคราะห์จะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อความเข้มข้นหรือปริมาณ NH_4Cl มีค่าต่ำประมาณ 0.2 % ในช่วงการผลิต PHB

Page (1992) ได้ทำการเลี้ยง *Azotobacter vinelandii* UWD ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อน (complex nitrogen source) ได้แก่ fish peptone, proteose peptone และ yeast extract พบว่า peptone ให้การผลิต PHB เพิ่มสูงถึง 25 เท่า และการเติม fish peptone ให้ปริมาณของ PHB ต่อโปรตีนของเซลล์เทียบเท่ากับการใช้กากน้ำตาล

Chang และคณะ (1994) พบว่าการจำกัดแหล่งไนโตรเจนให้กับ *Alcaligenes eutrophus* H16 มีผลให้มีการสะสม PHB และจากการเติม NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการสังเคราะห์ PHB นั้นพบว่าจะมีผลให้เกิดการหยุดชะงักและลดการสะสม PHB ภายในเซลล์

Kim และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองผลิต PHB ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* แบบ fed batch cultures โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสให้ได้ประมาณ 10-20 g/l รวมถึงควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้มีอย่างจำกัดจนกระทั่งเซลล์เจริญได้เต็มที่ หรือ ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด พบว่าการผลิต PHB สูงขึ้นโดยมี PHB content ประมาณ 76 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สาหรับ PHB productivity มีค่าเท่ากับ 2.42 g/l-h เมื่อเทียบอัตราส่วนของผลผลิตกับสารอาหารเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0.3 g PHB/g glucose

Martinez และคณะ (1995) เลี้ยงเชื้อ *Azotobacter chroococcum* H23 เพื่อผลิตสาร PHB โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารประกอบอนินทรีย์ในรูปแอมโมเนียม (NH_4^+) พร้อมกับการใช้น้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันมะกอก หรือ alpechin พบว่ามีการสังเคราะห์ PHB ได้ 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้งหลังจากการเลี้ยง 24 ชั่วโมง

4.2.3 อาหารเสริมเกลือแร่

การสะสม PHB จะเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล โดยมีปัจจัยบางชนิดจำกัด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ ซึ่งพบว่าฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และซัลเฟอร์นั้นจัดเป็นแร่ธาตุหลัก (major elements) จุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุเหล่านี้ในปริมาณมากพอสมควร โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมซึ่งจำเป็นมาก เนื่องจากเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ ดังนั้นในการสังเคราะห์พอลิเมอร์จะมีการจำกัดปริมาณแร่ธาตุหลักเหล่านี้ ซึ่งมีผลให้เกิดการสะสมแหล่งคาร์บอนและพลังงานอยู่ในเซลล์ในรูปพอลิเมอร์

4.3 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB เนื่องจากสภาวะออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทส (Citrate synthase) และไอโซซิเตรทดีไฮโรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) ถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ (Acetoacetyl-CoA) เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) จึงมีการสะสม PHB ซึ่งการที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัดยังมีผลต่อการลดการทำงานของกระบวนการหายใจในขณะที่ PHB จะทำหน้าที่เป็นแอ่งเก็บสารที่มีอนุภาพรีดิวซิ่ง (reducing power) หรือเป็นหน่วยควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox regulator) ภายในเซลล์ ซึ่งในสภาวะที่มีออกซิเจน พบว่าไม่ส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB (Luengo *et al.*, 2003)

Yang และคณะ (1999) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIM 11599 ด้วยการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และทำการควบคุมสภาวะโดยทำการควบคุมในลักษณะของ O_2

และ P inhibition รวมถึง O_2 และ P deficiency พบว่า O_2 และ P inhibition ส่งเสริมการผลิต PHB โดยผลิตได้ 111.8 g/l คิดเป็น PHB content 80.9% ของน้ำหนักแห้ง

4.4 พีเอช

พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHB พบว่าจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 7 และพบว่าเมื่อต้องการผลิต PHB ควรทำการควบคุมพีเอชไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในสภาวะเป็นกรดมากเกินไปเมื่อสิ้นสุดการเจริญ

Kinoshita และคณะ (1991) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการเจริญของ *A. eutrophus* No. 4 พบว่าการเจริญและการผลิตเกิดขึ้นได้ดี เมื่อพีเอชเริ่มต้นสูงกว่า 7 และพบว่าเมื่อต้องการผลิต PHB ในถังหมักควรให้มีค่าพีเอชสูงกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในสภาวะเป็นกรดมากเกินไป

4.5 อุณหภูมิ

จากการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHB ในช่วง 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHB ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Aslim และคณะ (1998) ศึกษาการผลิต PHB ด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม lactic acid bacteria พบว่าอุณหภูมิที่จีนัส *Lactobacillus* สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ในขณะที่จีนัส *Pediococcus* เจริญได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ *Streptococcus* เจริญได้ที่ 40 องศาเซลเซียส

5. การสกัดแยก PHB

PHB สะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ดังนั้นการแยกพอลิเมอร์ออกมาทำได้โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยการทำลายผนังเซลล์ ซึ่งในกระบวนการสกัดต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ ได้มีการตรวจสอบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของ PHB ที่ทำการแยกได้จากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ พบว่าค่าของมวลโมเลกุลแปรปรวนแตกต่างกันไป ซึ่งอิทธิพลที่มีผลมวลโมเลกุลคือ วิธีการที่ใช้สกัดนั่นเอง วิธีการสกัดแยก PHB สามรถแบ่งได้ 3 วิธีคือ

- การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดแยก PHB ด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีที่ให้ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่สกัดออกมามีมวลโมเลกุลสูง การสกัดทำโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม, เมทธีลีนคอลไรด์, 1-2 ไดคลอโรอีเธน, 1,1,2-ไตรคลอโรอีเธน หรือโพรไพลีน คาร์บอเนต เป็นต้น PHB ที่สกัดได้จากวิธีนี้มีสีขาว สามารถทำเป็นผลึกได้และมีมวลโมเลกุลสูงแต่วิธีนี้จะใช้เมื่อต้องการความบริสุทธิ์ของ

พอลิเมอร์สูงแต่ไม่เหมาะสมที่จะใช้ปฏิบัติในระดับอุตสาหกรรม เพราะต้องใช้สารสกัดในปริมาณมากแต่มีข้อดีคือสกัดได้ง่าย

- การสกัดด้วยโซเดียมไฮไปคลอไรท์

การสกัดวิธีนี้เป็นวิธีที่ Doi (1990) ใช้ในการแยกพอลิเมอร์ชนิด PHB จากเชื้อ *Bacillus cereus* โดยย่อยสลายผนังเซลล์นาน 30-60 นาที ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ พอลิเมอร์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยล้างด้วยไดเอทธิลอีเธอร์ หรือเมธานอล เพื่อแยกไขมันออก การใช้สภาวะในการสกัดที่มีความเป็นด่างสูงมีผลทำให้สายพอลิเมอร์ถูกทำลายมีผลต่อคุณสมบัติทางด้านพื้นผิวและมีผลต่อโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ ระยะเวลาในการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-60 นาที การใช้เวลาเกินกว่า 60 นาทีอาจมีผลทำให้พอลิเมอร์ถูกทำลายได้ สำหรับการแยก PHB ให้ได้ความบริสุทธิ์ถึง 95 % พบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวก่อนทำการสกัดช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของสารที่แยกได้สูงขึ้น ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะได้รับการพัฒนาแล้วแต่ปัญหาที่เกิดจากวิธีนี้คือยากที่จะกำจัดโซเดียมไฮโปคลอร์ที่ยังเหลือติดอยู่กับพอลิเมอร์ที่สกัดได้ และโซเดียมไฮโปคลอไรด์สามารถเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกเช่นกัน

- การสกัดด้วยเอนไซม์

การพัฒนากระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ศึกษาโดย Homles (1985) ซึ่งเป็นกระบวนการที่นิยมใช้กันในอุตสาหกรรม เป้าหมายของกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิต PHA ในปริมาณสูงโดยดูจากเปอร์เซ็นต์น้ำหนัก PHB ต่อน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ การสกัดแยกด้วยเอนไซม์มักใช้เอนไซม์หลายชนิดรวมกัน โดยเอนไซม์ที่ใช้ต้องไม่ย่อยกันเองเมื่อนำมาใช้รวมกัน เช่น อัลคาเลส (alcalase), ฟอสโฟไลเปส (phospholipase), แลคซิเตส (lacitase) และไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นต้น

6. การประยุกต์ใช้สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

การประยุกต์ใช้สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความหลากหลายในปัจจุบันเนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีที่หลากหลายโดยคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไปในกลุ่ม สามารถทำให้เกิดส่วนประกอบที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่นใช้แทนพลาสติกทนร้อน ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ ขวด ใช้เป็นแผ่นพลาสติกทางการเกษตร เป็นเส้นใยสิ่งทอ หรือใช้ในทางการแพทย์ แต่เนื่องจากผลิตภัณฑ์จากสารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีคุณภาพสูง ดังนั้นการนำไปประยุกต์ใช้ในปัจจุบันจึงนิยมใช้ใน 2 ลักษณะ คือ

6.1 การประยุกต์ใช้ทางด้านวัสดุภัณฑ์

พลาสติกผลิตขึ้นจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และสามารถหลอมละลายเป็นรูปร่างต่างๆ ได้โดยใช้แรงดันและความร้อน คุณสมบัติของพลาสติกคือ ไม่สลายตัว น้ำหนักเบา ทำให้สะดวกต่อ

การถือหิ้วและการขนส่งตลอดจนมีความทนทานอยู่ได้เป็นเวลานาน อย่างไรก็ตาม พลาสติกผลิตมาจากทรัพยากรธรรมชาติที่เกิดขึ้นใหม่ได้ยาก เช่น น้ำมันและถ่านหิน ยากต่อการนำมารีไซเคิล รวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องแยกพลาสติกแต่ละชนิดออกจากกัน ปัจจุบันจึงมีเพียงถุงพลาสติกเท่านั้นที่สามารถนำมาผลิตใช้ใหม่ได้ แต่ถุงพลาสติกที่ใช้แล้วเพียงร้อยละ 3 ของจำนวนถุงพลาสติกที่ผลิตออกมาเท่านั้นที่นำกลับเข้าสู่โรงงานเพื่อการรีไซเคิล ดังนั้นพลาสติกที่ถูกทิ้งเป็นขยะในปัจจุบันจึงคงอยู่ในสภาพแวดล้อม ต่อมาบริษัท ICI ของประเทศอังกฤษเริ่มผลิตพลาสติกชนิดใหม่ซึ่งย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ (biodegradable) มีชื่อเรียกทางการค้าว่า BIOPOL ซึ่งได้นำไปใช้งานอย่างจริงจัง โดยผลิตขึ้นจาก polyhydroxybutyrate ที่ผลิตจาก *A. eutrophus* ซึ่งเมื่อย่อยสลายแล้วจะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ ซึ่งแบคทีเรียและราที่มีอยู่ทั่วไปจะย่อยวัสดุชนิดนี้จนหมดสิ้นไปในเวลาเพียงไม่กี่สัปดาห์เท่านั้น เมื่อพลาสติกนี้สลายตัว ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมาสู่บรรยากาศจะมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับที่พืชใช้เพื่อผลิตเป็นกลูโคส ด้วยเหตุนี้จึงไม่มีการเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แก่บรรยากาศของโลก อันเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โลกมีอุณหภูมิสูงขึ้น และถ้าเติมกรดอินทรีย์บางชนิดลงไปในขั้นตอนการผลิต สามารถเปลี่ยนคุณสมบัติของ BIOPOL ให้เหมาะสมกับการใช้งานต่างๆได้ นอกจากนี้มีการพัฒนาพอลิเมอร์โดยบริษัท Monsanto ใช้ชื่อทางการค้าว่า Biopol™ ซึ่งประกอบด้วยพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PHB-co-HV ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์

6.2 การประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์

พันธะเอสเทอร์ของ PHB ถูกทำลายเมื่ออยู่ในสภาวะกรดหรือด่าง และเมื่อโดนเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์ หรืออยู่ในสภาวะที่ถูกย่อยสลายภายในเซลล์ซึ่งทำให้กิจกรรมการสร้าง PHB ลดลงและขับผลิตภัณฑ์ที่ถูกย่อยออกมาจากเซลล์ การย่อย PHB เพียงบางส่วนแล้วนำกลับมาผสมกับพอลิเมอร์อื่นจะทำให้เกิดคุณสมบัติเฉพาะตัวของสาร

DegraPol เป็น block-copolyesterurethane ซึ่งเกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมีระหว่าง PHB-diol กับ α,ω-dihydroxy-poly (ε-caprolactone-*block*-diethylene-*block*-ε-caprolactone) ซึ่งจะให้คุณสมบัติการรวมตัวที่ดีกับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ซึ่งความสามารถในการเข้ากับเนื้อเยื่อของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น รูปร่าง ความพรุนผิว และคุณสมบัตทางเคมีของวัสดุ รวมไปถึงสภาพของเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้อง จากการศึกษาพบว่าวัสดุภัณฑ์บางประเภทที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น ซิลิโคน มีความเป็นไปได้ที่จะก่อให้เกิดผลกระทบที่เป็นอันตรายและก่อให้เกิดมะเร็ง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ PHB จะกลายมาเป็นองค์ประกอบสำคัญที่จะนำมาใช้ในทางการแพทย์ นอกจากนี้พบว่าโครงสร้าง R-3-hydroxybutyrate acid เป็นหนึ่งในองค์ประกอบของเลือดซึ่งมีความเข้มข้น 0.3-1.3 mM และสามารถพบได้ในกลุ่มเซลล์ยูคาริโอตจึงทำให้ PHB สามารถเข้า

กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ และ PHB มีคุณสมบัติสลายตัวได้ต่ำในร่างกายเมื่อเปรียบเทียบกับ heteropolymer เช่น poly (lactate-co-glycolate) นอกจากนี้คุณสมบัติที่สามารถเกิดผลึกได้สูงถึง 60-90 % ทำให้จับกับเอนไซม์สำหรับสลายตัวได้ยาก และลดปัญหาการจับกับเอนไซม์ดังที่กล่าวมาแล้ว (Zinn *et al*., 2001) สำหรับการประยุกต์ใช้ PHB ทางด้านการแพทย์พอสรุป ดังตารางที่ 5 ซึ่งแบ่งเป็น 4 ประเภทย่อย ดังนี้

1. The temporary scaffold การใช้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพสำหรับ The Temporary Scaffold สามารถพิจารณาจากกรณีที่เนื้อเยื่อ (natural tissue bed) ถูกทำลายหรือได้รับบาดเจ็บอันเป็นผลมาจากเชื้อโรค การผ่าตัด ซึ่งเนื้อเยื่อเหล่านี้อาจเกิดเป็นแผล (healing wound) กระดูกหัก หรือเส้นเลือดแตก ทำให้เนื้อเยื่อเหล่านี้ต้องการโครงสร้างเสริมเทียม (artificial support) เพื่อช่วยในการรักษาซึ่ง ได้แก่ ไหมเย็บแผล อุปกรณ์ซ่อมกระดูก เช่น หมุดกระดูก สกรู วัสดุเพื่อใช้ในการปลูกถ่ายที่สามารถย่อยสลายเหล่านี้สามารถรักษาตัวเองและกลับเป็นปกติได้วัสดุที่นำมาใช้ทำ The Temporary Scaffold ควรจะต้องมีคุณสมบัติพื้นฐาน คือ สามารถถ่ายเทความเค้นทีละเล็กละน้อย เช่น วัสดุสำหรับการปลูกถ่ายควรสามารถย่อยสลายให้ได้กับอัตราส่วนความสามารถในการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อ

2. The temporary barrier หน้าที่หลักของ Temporary Barrier คือใช้ป้องกันการยึดติดของเนื้อเยื่อ (adhesive prevention) ซึ่งยึดติดกันระหว่างเนื้อเยื่อสองส่วน สามารถเกิดขึ้นได้โดยทั่วไปในการผ่าตัดเนื่องจากเกิดการจับตัวเป็นก้อนของเลือด ซึ่งอาจทำให้เกิดการอักเสบ (inflammation) หรือการเกิดเนื้อเยื่อเพื่อซ่อมแซม (fibrosis) ตามมา ยิ่งไปกว่านั้นการยึดติดของเนื้อเยื่ออาจทำให้เกิดความเจ็บปวด หรือปัญหาของการผ่าตัดตามมา รูปแบบของ Temporary Barrier อาจเป็นฟิล์มบาง หรือวัสดุคล้ายตาข่าย ซึ่งจะวางไว้ระหว่างเนื้อเยื่อซึ่งมีแนวโน้มจะติดกันในระหว่างการผ่าตัด หรือผิวหนังเทียมสำหรับแผลไฟไหม้ก็เป็นอีกกรณีที่ใช้ Temporary Barrier

3. The drug delivery device ซึ่งถูกปลูกถ่ายไว้ในร่างกายจะทำหน้าที่ควบคุมการส่งยาเข้าไปในอวัยวะที่ต้องการทำการรักษาในปริมาณที่เหมาะสม ยกตัวอย่างเช่น อุปกรณ์ที่สามารถส่ง insulon เข้าไปในร่างกายผู้ป่วยโรคเบาหวาน

4. Multifunctional devices เป็นอุปกรณ์ที่สามารถทำหน้าที่หลายอย่างในอุปกรณ์ตัวเดียวกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับการออกแบบวัสดุให้ได้สมบัติตามที่กำหนด ตัวอย่างเช่น หมุดหรือสกรูสำหรับอุปกรณ์ซ่อมกระดูกที่ทำจาก ultrahigh strength poly(lactic acid) สามารถทำหน้าที่ทั้งเสริมความแข็งแรง (mechanical support) และควบคุมการส่งยา (drug delivery) ในเวลาเดียวกันซึ่งอาจแทนการใช้ poly (lactic acid) ด้วย PHB

2. แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจัดอยู่ในกลุ่ม Anoxygenic phototrophic bacteria เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นท่อน โค้ง รูปไข่ หรืออาจจะต่อกันเป็นสาย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์มีตั้งแต่ 0.3 จนถึงมากกว่า 0.6 ไมโครเมตร ขยายพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์ (binary fission) แต่บางสายพันธุ์ขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding) เซลล์มีสีม่วง-แดง น้ำตาล-ส้ม น้ำตาล-เหลือง น้ำตาล และเขียว สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติในสภาพไร้อากาศ-มีแสง เช่น ในแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม บ่อน้ำพุกำมะถัน และในดินโคลน (Pfenning, 1967; Shipman, *et al.,* 1977; Imhoff, 1988) มีรงควัตถุทั้งแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์และแคโรทินอยด์ การสังเคราะห์แสงจะแตกต่างกับการสังเคราะห์แสงที่เกิดขึ้นในพืชและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Staley *et al.,* 1989) กล่าวคือในพืชและสาหร่ายจะใช้ระบบแสง 2 ระบบ และมีการสร้างออกซิเจน (oxygenic photosynthesis) ซึ่งเกิดจากใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนเหล่านี้จะรีดิวซ์ NADP ไปเป็น NADPH ในขณะเดียวกันก็จะมีการผลิตออกซิเจนออกมา ส่วนการสังเคราะห์แสงในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะไม่มีการสร้างออกซิเจนเกิดขึ้น (anoxygenic photosynthesis) เนื่องจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้แก๊ซไฮโดรเจน และสารประกอบซัลเฟอร์ในรูปรีดิวซ์ หรือสารอินทรีย์ เช่น มาเลท อะซิเตท ไพรูเวท เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแทนน้ำ และการสังเคราะห์แสงใช้ระบบแสงเพียงระบบเดียว (Atlas, 1995)

ระบบรงควัตถุของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง จะมีหน้าที่สำคัญในการเก็บรวบรวมพลังงานแสง ระบบนี้ประกอบด้วยแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์หลายชนิด ซึ่งมีการดูดกลืนแสงได้แตกต่างกัน ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเมื่อแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ถูกกระตุ้นด้วยแสงจะทำให้เกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมา (Bchl $\longrightarrow$ $Bchl^{+}$ + e^{-}) และถูกส่งไปยังตัวรับต่างๆ ได้แก่ unidentified electron acceptor, ubiquinone, cytochrome b_{50} และ cytochrome c_2 ตามลำดับ ในขั้นตอนการส่งอิเล็กตรอนจาก cytochrome b_{50} ไปยัง cytochrome c_2 จะมีการสังเคราะห์ ATP เกิดขึ้น ซึ่งการสังเคราะห์ ATP จะเกิดขึ้นแบบวัฏจักร (Brock and Madigan, 1991)

การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์จัดอยู่ในอันดับ (Order) *Rhodospirillales* สามารถแบ่งตามชนิดของรงควัตถุ ลักษณะทางกายภาพ (physiological) ลักษณะทางด้านรูปร่าง (morphology) และคุณสมบัติทางชีวเคมี ออกได้ 3 กลุ่ม คือ Purple phototrophic bacteria, Green phototrophic bacteria และ Genera incertae sedis (Schlegel, 1984) สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

Table 4. Characteristics of photosynthetic bacteria.

Major group of photosynthetic bacteria	Bacteriochlorophyll	Electron donor	Growth condition
Purple sulfur bacteria	*a* or *b*	H_2S, $Na_2S_2O_3$, H_2 Organic compound; acetate	photoautotroph and photoheterotroph (O_2 was not necessary)
Purple nonsulfur bacteria	*a* or *b*	H_2, Organic compound; succinate, malate	photoheterotroph or photoautotroph (O_2 was not necessary), heterotroph (O_2 was necessary at dark condition)
Green sulfur bacteria	*a* and *c*, *d* or *e*	H_2S, $Na_2S_2O_3$, H_2	photoautotroph (O_2 was not necessary),
Genera incertae sedis	*g*	H_2, S, Organic compound; citrate	photoautotroph and photoheterotroph (O_2 was not necessary)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Staley และคณะ (1989)

1. Purple phototrophic bacteria

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอและบี มี 3 วงศ์ (Staley *et al.*, 1989) คือ

1.1 วงศ์ *Chromatiaceae* หรือ purple sulfur bacteria มีรูปร่างกลม รูปไข่ แท่ง รูปโค้ง และรูปเกลียว มีทั้งที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ พวกที่เคลื่อนที่ได้มีแฟลกเจลลา (flagella) ที่ขั้วแบบ monotrichous หรือแบบหลายเส้น (multitrichous) มีการแบ่งเซลล์แบบ binary fission มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ชนิด *a* เมื่อเจริญภายใต้สภาวะไร้อากาศจะมีรูปแบบการเจริญลักษณะ photolithoautotrophic โดยสามารถใช้ซัลไฟด์หรือซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถจำแนกตามคุณสมบัติทางชีวเคมีได้เป็น 9 จีนัสดังนี้ Genus *Chromatium*, Genus *Thiocystis*, Genus *Thiospirillum*, Genus *Thiocapsa*, Genus *Lamprocystis*, Genus *Thiodictyon*, Genus *Amoebobacter* และ Genus *Thiopedia*

1.2 วงศ์ *Ectothiorhodospiraceae* มีรูปร่างเป็นเกลียว โค้งหรือแท่งสั้นๆ สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากมีแฟลกเจลลาที่ขั้ว มีการแบ่งเซลล์แบบ binary fission อาจพบ gas vacuoles ภายในเซลล์ สามารถใช้ทั้ง bacteriochlorophyll และ carotenoid เป็นรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสง การเจริญภายใต้สภาวะมีแสง-ไร้อากาศพบว่าสามารถใช้สารประกอบซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็ตรอน และสารประกอบซัลไฟด์สามารถถูกออกซิไดซ์เป็นซัลเฟอร์ ซึ่งท้ายที่สุดจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบซัลเฟตภายนอกเซลล์ สามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ในทะเลโดยเฉพาะบริเวณทีมีปริมาณเกลือสูงและซัลไฟด์สูง รวมถึงเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างสูง แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถจำแนกตามคุณสมบัติทางชีวเคมีได้เป็น Genus *Ectothiorhodospira*

1.3 วงศ์ *Rhodospirillaceae* หรือ purple nonsulfur bacteria มีรูปร่างกลม รูปไข่ แท่ง รูปโค้งและรูปเกลียว สามารถเคลื่อนที่ได้และไม่ได้พวกที่เคลื่อนที่ได้มีแฟลกเจลลา (flagella) ที่ขั้วแบบ peritrichous มีการแบ่งเซลล์แบบ binary fission หรือ budding สีที่เกิดขึ้นพบได้ตั้งแต่เขียว เขียวอมเหลือง น้ำตาลอมเหลือง น้ำตาลแดง แดง หรือม่วง อาจพบ bacteriochlorophyll ชนิด *a* หรือ *b* สำหรับการเจริญภายใต้สภาวะไร้อากาศ-มีแสงจะมีรูปแบบการเจริญแบบ photoheterotrophs โดยสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ได้หลากหลาย หรืออาจเจริญแบบ photoautotrophs ซึ่งจะพบว่ามีการใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือซัลเฟอร์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน และใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสงจะมีรูปแบบการเจริญแบบ chemoheterotrophs หรือ chemoautotrophs แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถจำแนกตามคุณสมบัติทางชีวเคมีได้เป็น 6 Genus คือ Genus *Rhodospirillum*, Genus *Rhodopila*, Genus *Rhodobacter*, Genus *Rhodopseudomonas*, Genus *Rhodomicrobium* และ Genus *Rhodocyclus*

2. Green bacteria

2.1 วงศ์ *Chlorobiaceae* หรือ green sulfur bacteria

เซลล์มีลักษณะกลม รูปไข่ และบางครั้งอาจพบเป็นท่อนสั้นตรง (straight rod-shaped) หรือท่อนสั้นโค้ง (curved rod-shaped) มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศด้วยการ binary fission ซึ่งอาจพบการแบ่งเซลล์แล้วติดกันเป็น 3 เซลล์ สำหรับจีนัส *Chlorohereton* สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยการคืบคลาน (gliding) ในขณะที่จีนัสอื่นๆไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยทั่วไปอาจจะพบ gas vacuole ภายในเซลล์ รวมถึงพบรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสงอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และโครโมโซม ระหว่างการเจริญของเซลล์จะมีการผลิตสารสี หรือรงควัตถุในกลุ่มของแคโรทินอยด์แตกต่างไปตามแต่ละสายพันธุ์ โดยกลุ่มที่เจริญแล้วมีการผลิตสีเขียว (grass-green) จะมีการผลิตแคโรทินอยด์กลุ่ม chlorobactene รวมถึงมีการผลิตรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสง (bacteriochlorophyll) ชนิด *c* หรือ *d* โดยมีการผลิตชนิด *a* เพียงเล็กน้อย ในขณะที่กลุ่มที่เจริญแล้วมีการผลิตสีน้ำตาล (chocolate-brown) จะมีการผลิตแคโรทินอยด์กลุ่ม isorenieratene และผลิตรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสง (bacteriochlorophyll) ชนิด *e* โดยมีการผลิตชนิด *a* เพียงเล็กน้อย แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็น strictly anaerobic และ obligately phototrophic รวมถึงสามารถเจริญในสภาวะที่เป็น photolithoautotroph ที่มีซัลไฟด์หรือ ซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถจำแนกตามคุณสมบัติทางชีวเคมีได้เป็น 5 Genus คือ Genus *Chlorobium*, Genus *Prosthecochloris*, Genus *Pelodictyon*, Genus *Ancalochloris* และ Genus *Chloroherpeton*

2.2 วงศ์ *Chloroflexaceae* หรือ green nonsulfur bacteria หรือ Multicellular filamentous green bacteria

เซลล์มีลักษณะเป็น muticellular filaments ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้แบบคลืบคลาน (gliding motility) ยกเว้นสกุล *Heliothrix* มีการเคลื่อนที่แบบคลืบคลานแต่ไม่มีแฟลกเจลลา ความแตกต่างของวงศ์นี้กับวงศ์ *Chlorobiaceae* หรือ green sulfur bacteria คือ สามารถเจริญได้ในสภาวะ facultative aerobic และสามารถใช้สารอินทรีย์ในสภาวะที่มีการให้แสง โดยสารประกอบกลุ่มรีดิวซ์ซัลเฟอร์ไม่ได้เป็นสารให้อิเล็กตรอนตัวสำคัญ ในขณะที่ รงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสงพบทั้งชนิด *a, c* หรือ *d* ขึ้นกับสกุล และพบ chlorosomes ซึ่งเป็นบริเวณที่มีส่วนช่วยในการกักเก็บแสง (light-harvesting apparatus) ยกเว้นสายพันธุ์ *Heliothrix oregonensis* บางสายพันธุ์มีการผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถจำแนกตามคุณสมบัติทางชีวเคมีได้เป็น 4 Genus คือ Genus *Chloroflexus,* Genus *Heliothrix,* Genus *Oscillochloris* และ Genus *Chloronema*

3. Genera incertae sedis

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์จี มีสีเขียวออกน้ำตาลอ่อน เซลล์รูปไข่หรือรูปท่อน เคลื่อนที่ได้ มีแฟลกเจลลาที่ขั้ว เป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจน เจริญได้ดีในที่ที่มีแสง เป็นทั้งพวกโฟโตเฮเทอโรโทรฟ (Photoheterotroph) และออโตโทรฟ (Autotroph) ธาตุซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6.5-7 และเจริญที่อุณหภูมิช่วงกว้างตั้งแต่ 38-52 องศาเซลเซียส พบว่า DNA G+C content มีค่าประมาณ 52-55 mol% แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 Genus คือ Genus *Heliobacterium* เช่น *Heliobacterium chlorum* และ Genus *Erythrobacter* เช่น *Erythrobacter longus*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์กลาย ที่มีคุณสมบัติในการผลิตโคโพลิเมอร์
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตสารโคพอลิเมอร์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้
3. เพื่อคัดเลือกสารสกัดสำหรับพอลิเมอร์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลาย
4. เพื่อศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติเบื้องต้นของโคพอลิเมอร์

ขอบเขตการวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลายที่ผลิตโคพอลิเมอร์ จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสาร Poly-β(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) ของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มที่คัดเลือกได้ และคัดเลือกในการสกัดสารพอลิเมอร์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม รวมถึงศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติเบื้องต้นของโคพอลิเมอร์

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. สามารถคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์กลายที่ผลิตโพลิเมอร์
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารโคพอลิเมอร์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้
3. สามารถคัดเลือกสารสกัดที่เหมาะสมสำหรับพอลิเมอร์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลาย
4. สามารถพิสูจน์ชนิดของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากการศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติเบื้องต้น