บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมีการใช้ผลิตภัณฑ์พลาสติกซึ่งเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์จากกระบวนการทางปิโตรเคมี ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านั้นไม่สามารถย่อยสลายได้ เช่น พอลิโพรพิลีน (polypropylene) พอลิยูรีเธน (polyurethane) พอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride) เป็นต้น เนื่องจากพอลิเมอร์สังเคราะห์เหล่านี้มีคุณสมบัติคงทน แข็งแรง น้ำหนักเบา ราคาถูก และสามารถปรับแต่งให้มีลักษณะตามต้องการได้ ทำให้มีการนำพอลิเมอร์สังเคราะห์มาใช้เพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เพราะไม่สามารถย่อยสลายได้ ทั้งปัญหาในเรื่องของมลพิษ และปัญหาในการจัดการกับปริมาณของขยะจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ

พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (poly-β- hydroxyalkanoates) หรือ PHA เป็นกลุ่มพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดพอลิโพรพิลีนมีคุณสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic polyester) สามารถนำไปใช้ได้หลายๆลักษณะ เช่น แผ่นฟิล์ม (film), เส้นใย (fiber), หรือรูปทรงต่างๆ เช่นเดียวกับพอลิเมอร์สังเคราะห์และเนื่องจากพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงสามารถถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและสามารถกำจัดให้หมดไปด้วยจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน แต่กระบวนการผลิตพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากการหมักมีต้นทุนการผลิตสูงกว่าพอลิเมอร์สังเคราะห์ เนื่องจากมีต้นทุนของวัตถุดิบและค่าใช้จ่ายในการทำบริสุทธิ์สูง แนวทางการพัฒนากระบวนการผลิตพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอต แบ่งออกเป็นสามแนวทาง คือ แนวทางการพัฒนาด้านการคัดเลือกสายพันธุ์ โดยอาศัยวิธีการทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (genetic engineering) เพื่อให้จุลินทรีย์มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสม PHA มากขึ้น แนวทางที่สองการพัฒนากระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์เพื่อให้สกัดแยกได้มากขึ้น และลดค่าใช้จ่ายลงและแนวทางสุดท้ายคือการพัฒนากระบวนการหมัก

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Ralstonia eutropha* เป็นแนวทางที่น่าสนใจที่สุดในปัจจุบัน เนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถสังเคราะห์และสะสมพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตไว้ภายในเซลล์ได้ในปริมาณที่มาก และสามารถใช้สารอาหารได้หลายชนิดและใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกได้ (Lee, 1995) และเป็นเชื้อที่ให้ค่าอัตราผลผลิตสูง (Kim *et al*., 1994) โดยปกติเชื้อจุลินทรีย์จะสร้างพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ในสภาวะที่มีสารอาหารต่างๆไม่สมดุลหรือเข้าสู่สภาวะที่มีอาหารขาดแคลน เช่น ขาดแคลนไนโตรเจน ขาดแคลนออกซิเจน เป็นต้น

ดังนั้น การใช้น้ำเสียเป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตPHA เป็นการลดต้นทุนของวัตถุดิบและพัฒนากระบวนการหมักเพื่อลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพและเพิ่มศักยภาพในการใช้พอลิเมอร์ชีวภาพทดแทนพอลิเมอร์สังเคราะห์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ และการผลิตสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) ของ *Ralstonia eutropha*
2. ศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้กับพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ในทางการค้า

ตรวจเอกสาร

1. Polyhydroxyalkanoates (PHA)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) เป็นกลุ่มพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ซึ่งจุลินทรีย์สะสมไว้ในสภาวะที่ไม่สมดุล คือมีปริมาณสารอาหารที่จำเป็น (essential nutrient) เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส หรือแมกนีเซียม เป็นต้น อยู่ในปริมาณน้อย แต่มีปริมาณสารอาหารจำพวกคาร์บอนในปริมาณมาก จึงเกิดการสะสมสารพลังงานสูงอยู่ในรูปพอลิเมอร์ มีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์พอลิโพรพิลีน (polypropylene) (ตารางที่1) สามารถทนอุณหภูมิสูง เพราะมีอุณหภูมิในการหลอมเหลวสูงถึง 180 ^{0}C มีคุณสมบัติเป็นฟิล์มกันน้ำและความชื้นได้ดีแต่จะแตกต่างจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ สามารถย่อยสลายได้ง่ายทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อราจำพวก *Penicillium* ซึ่งจุลินทรีย์พวกนี้จะมีเอนไซม์ PHA depolymerase สามารถย่อยสลาย PHA ได้

นอกจากนี้ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) ยังมีความสามารถในการเกิดผลึกสูง คือมีเปอร์เซนต์การเกิดผลึกอยู่ระหว่าง 55-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีผลทำให้ PHA มีความแข็งสูง และอุณหภูมิคล้ายแก้ว (glass temperature, T_g) ของ PHA มีค่าประมาณ 5 องศาเซลเซียส ส่วนคุณสมบัติทางกลของ PHA ชนิดต่างๆแสดงในตารางที่ 2 เช่น ค่าแรงดึง (tensile strength) และค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาด (% elongation break) มีค่าเท่ากับ 40 MPa และ 5 % ตามลำดับ จะเห็นว่าค่าแรงดึงของ P (3HB) มีค่าใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีนแต่ค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวยังมีความแตกต่างกันมาก (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของพอลิโพรพิลีน (PP) เปรียบเทียบกับพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB)

Table 1. Properties of prolypropylene (PP) and polyhydroxybutyrate (PHB)

	PHB	PP
Melting point (^{0}C)	175	176
Molecular weight (Daltons)	$5x10^6$	$2x10^6$
Glass transition temperature (^{0}C)	-4	-10
Density (g cm^{-3})	0.905	1.25
Tensile strength (MPa)	40	38
Extention to break (%)	6	400
Ultraviolet resistance	good	poor
Solvent resistance	poor	good

ที่มา : Hocking and Marchessault (1994)

การนำ PHB ไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายด้าน (Jogdand, 2004) ได้แก่

1. บรรจุภัณฑ์อาหาร เช่น ฟิล์ม กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถ้วยพลาสติก
2. ใช้เป็นตัวห่อหุ้มที่ย่อยสลายได้ เพื่อค่อยๆ ปลดปล่อยสารที่บรรจุอยู่ภายในออกมาอย่างช้าๆ เช่น ยา สารกำจัดแมลง สารกำจัดวัชพืช ปุ๋ย เป็นต้น
3. วัสดุหรืออุปกรณ์ที่ใช้เพียงครั้งเดียวแล้วทิ้ง (disposal items) ตัวอย่างเช่น มีดโกน เครื่องใช้ในครัวเรือน ผ้าอ้อม ขวดแชมพู กล่องบรรจุเครื่องสำอาง เป็นต้น
4. ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารประกอบพวก chiral compounds
5. การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

PHA จะประกอบด้วยหน่วยย่อยของมอนอเมอร์มารวมกันซึ่งประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ (R)-3HA ซึ่งจะอยู่ในรูป R-configuration ทำให้มีความจำเพาะของสเตอริโอไอโซเมอร์ของการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของเอนไซม์ PHA synthase และมีเพียงส่วนน้อยที่มีลักษณะเป็นส่วนหนึ่งของ S-configuration PHA ที่รู้จักกันดีคือพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) ประกอบขึ้นจากหน่วยของ (R)-3HB น้ำหนักโมเลกุลของ PHA อยู่ในช่วง 200,000 – 3,000,000 ดาลตันขึ้นอยู่

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของ PHBV และพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ

Table 2. 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-3HB)[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

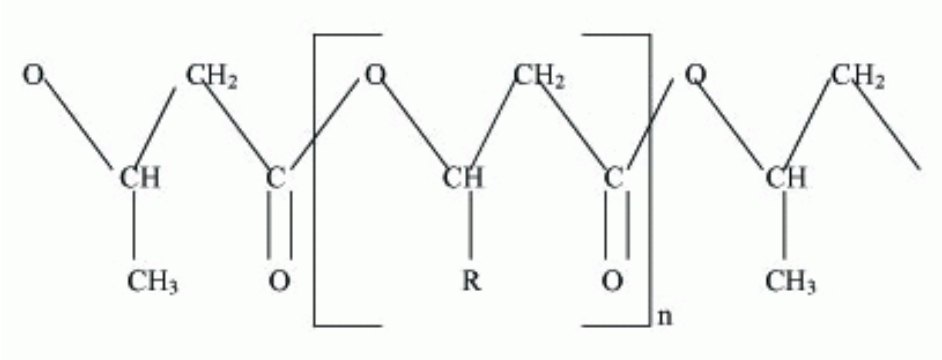
[a] Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [b] Data not available

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

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

ที่มา : Lee (1995)

กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะในการเจริญของเชื้อ (Sudesh *et al*., 2000) การเกิดเป็นสายพอลิเมอร์ยาวหรือสั้นขึ้นอยู่กับจำนวนมอนอเมอร์ที่มาต่อรวมกัน การเรียกชื่อ PHA จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของหน่วยย่อย R (side chain) ที่มาต่อตรงตำแหน่งเบต้า (β) หรือตำแหน่งที่ 3 ของสายพอลิเมอร์ หลัก หมู่ R อาจเป็นหมู่ methyl ($-CH_3$) (ภาพที่1)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

Figure 1. Chemical structure of polyhydroxyalkanoates.

ที่มา : Khanna และ Srivastava (2005)

1.1 การแบ่งกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

สารประกอบ PHA สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1.1.1 โฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer)

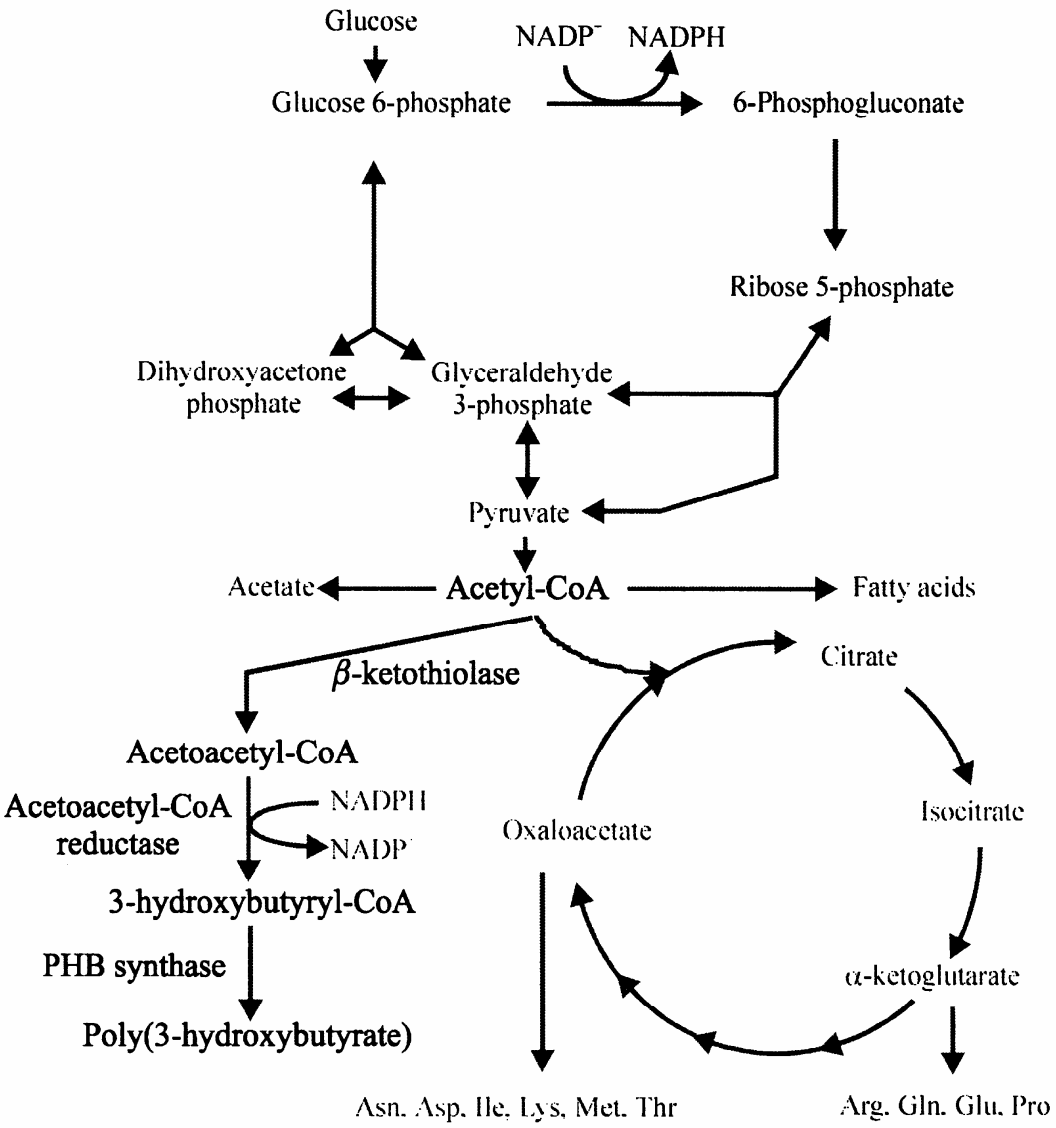
โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของพอลิเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกัน เช่น PHB หรือพอลี-เบต้า-ไฮดรอกซ์บิวทิเรต (poly -β-hydroxybutyrate) เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ของPHA ซึ่งอยู่ในกลุ่มโฮโมพอลิเมอร์ที่มีสายสั้นและมีโครงสร้างง่ายที่สุด ทำเป็นผลึกได้ถึง 50 % มีหมู่ R หรือ side chain คือหมู่เมทธิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีคุณสมบัติคล้ายพอลิเมอร์สังเคราะห์คือ พอลิโพรพิลีน

1.1.2 โคพอลิเมอร์ (Copolymer)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของพอลิเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน เช่น P(3HB-co-3HV) หรือเรียกว่า poly(3- hydroxybutyrate-copolymer-3- hydroxyvalerate) ซึ่งสามารถผลิตได้จากเชื้อ *Alcaligenese eutrophus ,Rhizobium meliloti* เป็นต้น

1.2 กระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่มของสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

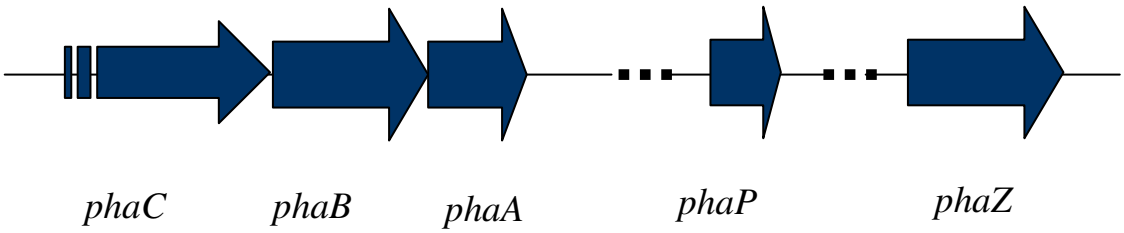
วิถีการสังเคราะห์สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยเริ่มต้นจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ (Hydroxylbutyryl-CoA) ด้วยการทำงานของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-coA reductase) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) ของไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB ซินทิเทส (PHB synthetase) อย่างไรก็ตาม PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส (hydroxybutyrate dehydrogenase) เมื่อพิจารณา PHB ภายในเซลล์พบว่ามีลักษณะเป็นgranule โดยมี monolayer phospholipid membrane ห่อหุ้มอยู่โดยอาจพบว่ามีโปรตีนบางชนิดสำหรับสังเคราะห์และย่อยสลายแทรกกระจายสอดแทรกอยู่โดยรอบ และการควบคุมการผลิต 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 และวิถีการสังเคราะห์สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตแสดงดังภาพที่ 2 และภาพที่ 3



ภาพที่ 2 วิถีการสังเคราะห์สารพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

Figure 2. The general PHB biosynthesis pathway.

ที่มา : Reddy และคณะ (2003)



ภาพที่ 3 ลักษณะของ *phaCBA* cluster สำหรับการสังเคราะห์ PHA

Figure 3. *phaCBA* cluster for PHA biosynthesis

ที่มา : Luengo และคณะ(2003)

การที่มี 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 ออกมาในสภาพที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ 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)

1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA

1.3.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ในการผลิต PHA ก็จะมีผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย กล่าวคือบางสายพันธุ์ของจุลินทรีย์อาจผลิตพอลิเมอร์ออกมาในรูป

โฮโมพอลิเมอร์ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิตพอลิเมอร์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ เช่นเมื่อให้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่ *A.eutrophus* R3 พบว่ามีการผลิตพอลิเมอร์ในรูป P(3HB-co-3HV) แต่เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนเดิมให้แก่ *A.eutrophus* ATCC17697 พบว่ามีการผลิต PHB ซึ่งเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (Anderson และ Wynn, 1995)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการผลิตสาร PHB จากจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 และในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์

ตารางที่ 3 การสะสมสาร PHB ในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Table 3. 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)

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%

1.3.2. แหล่งสารอาหาร

1.3.2.1 แหล่งคาร์บอน

จากที่พบว่าในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ PHA ได้และใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยที่แหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่แบคทีเรียนำมาใช้สังเคราะห์ PHA มีหลายชนิด ได้แก่ glucose, fructose, gluconate, acetic acid, betaine, caboric acid, citric acid, butyric acid, lactic acid, propionic acid เป็นต้น ดังนั้นในการผลิตจึงต้องศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจึงจะทำให้การผลิตเกิดขึ้นได้ดีสำหรับการผลิต PHB ในรูปโคพอลิเมอร์ นิยมใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดรวมกัน คาร์บอนแต่ละชนิดที่ใช้มีผลต่อองค์ประกอบของโคพอลิเมอร์

Ruan และคณะ (2003) ศึกษาการใช้ fructose และ butyric acid เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้ fructose ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ butyric acid ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่า fructose สามารถให้ความเข้มข้นของเซลล์ 12.3 มก.ต่อลิตร ซึ่งมากกว่าใช้ butyric acid ซึ่งให้ความเข้มข้นของเซลล์ 2.4 มก.ต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จะเห็นว่า fructose ให้ปริมาณของเซลล์สูงกว่า butyric acid จึงได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ในช่วงแรกโดยใช้ fructose และแอมโมเนีย หลังจากนั้นจึงมีการเติมกรดไขมันระเหยง่าย (VFA) จากถัง UASB ที่หมักน้ำเสียสังเคราะห์จากกลูโคสแบบไร้อากาศ ความเข้มข้นของกรดระเหยง่ายเป็น 150 กรัมต่อลิตร ก่อนเข้าสู่ถังหมักขนาด 2 ลิตร ในระยะเวลา 20 ถึง 70 ชั่วโมง ที่อัตรา 0.3-0.5 กรัมต่อลิตร พบว่าก่อนชั่วโมงที่ 20 เมื่อมีการเติม fructose กับ NH_4 เซลล์จะมีการเจริญเติบโตและจะมีการผลิต PHA เพียงเล็กน้อย แต่หลังจากที่มีการเติมกรด butyric acid, propionic acid และ acetic acid เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสและจำกัด NH_4 ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน หลังจากชั่วโมงที่ 20 พบว่ามีการผลิต PHA เพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 9.8 กรัมต่อลิตร ในเวลา 20 ชั่วโมงเป็น 15.9 กรัมต่อลิตร จนสิ้นสุดการหมัก ความเข้มข้นของ PHA เพิ่มขึ้นจาก 1.9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 20 เป็น 9.8 กรัมต่อลิตร หลังจากสิ้นสุดการหมัก

Yu (2001) ศึกษาการผลิต PHA จากน้ำเสียที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบโดยใช้กระบวนการหมักสองขั้นตอนโดยขั้นตอนแรกใช้ระบบไร้อากาศ UASB (upflow anaerobic sludge blanket) ได้กรดไขมันระเหยง่ายออกมาร้อยละ 43 โดยกรดไขมันระเหยนี้จะประกอบด้วย กรดอะซิติกร้อยละ 60 –80 กรดโพรพิโอนิกร้อยละ 10 – 30 และกรดบิวทิริกร้อยละ 5 – 40 หลังจากนั้นนำน้ำที่ออกจากระบบ UASB ไปกรองเพื่อนำส่วนใสไปใช้ในขั้นตอนที่สอง โดยมีกรดไขมันระเหยง่ายเป็นแหล่ง

คาร์บอน และมีการเติม Na_2HPO_4 4.8 กรัมต่อลิตร, $KH_2PO_4$2.65 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4$ 0.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ในสภาวะมีอากาศในขั้นตอนที่สองเพื่อผลิตสาร PHA พบว่าสามารถผลิต PHA ได้ 1.2 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 34 %ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Lee และ Yu (1997) ได้ศึกษาการการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้จากตะกอนสลัดจ์ชุมชนในระบบสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการย่อยสลายตะกอนสลัดจ์แบบไร้อากาศโดยแบคทีเรียพวก thermophilic และในขั้นตอนที่ 2 จะนำส่วนของเหลวที่ผ่านจากขั้นตอนแรกมาเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* เพื่อผลิต PHA ในถังหมักที่มีการกวน 50 rpm และให้อากาศ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* สามารถลดปริมาณกรดส่วนของเหลวที่ผ่านจากขั้นตอนแรก โดยไม่มีการควบคุม pH และมีการควบคุมปริมาณไนโตรเจน ผลการทดลอง พบว่า กรดอะซิติกลดลง87.6% กรดโพรพิโอนิกลดลง 62.6% กรดบิวทิริกลดลง 56.8% และกรดวาเลอริกลดลง 32% สามารถผลิต PHA ได้ 0.61 กรัมต่อลิตร หรือ34% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Bormann และ Roth (1999) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Methyllobacterium rhodesianum* และ *Ralstonia eutropha* เพื่อใช้ผลิตสาร PHB โดยทำการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีการเติม glycerol สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Methylobacterium rhodesianum* สามารถผลิตสาร PHB ได้ภายในระยะเวลา 92 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตได้ 39 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์พบว่าสามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นเป็น 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และใช้เวลาน้อยลงเพียง 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

1.3.2.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เคซีน เปบโตน yeast extract และ corn-steep liqour รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ การเติมเกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) ต่างๆ สำหรับการผลิตสาร PHB พบว่าจะเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัดกล่าวคืออัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับไนโตรเจนมีค่าสูง

Grothe และคณะ (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อ *Alcaligenes latuss* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้มีค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) มีค่า 28.3

ซึ่งมีผลให้มีการผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 4.6 กรัมต่อลิตร

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

Kim และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองผลิต PHB ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *Alcaliginase eutrophus* แบบ fed batch cultures โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสให้ได้ประมาณ 10 -20 กรัมต่อลิตร รวมถึงควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้มีอย่างจำกัดคือ 60–70 กรัมต่อลิตร จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตได้เต็มที่ หรือความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดพบว่าการผลิต PHB สูงขึ้นโดยมี PHB content ประมาณ 76 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง PHB productivity มีค่าเท่ากับ 2.42 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบอัตราส่วนของผลผลิตกับสารอาหารเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0.3 g PHB/g glucose

1.3.2.3 ฟอสฟอรัสและอาหารเสริมเกลือแร่

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

Ryu และคณะ (1996) ได้ศึกษาการผลิต poly-β-hydroxybutyrate (PHB) โดยเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีปริมาณฟอสเฟตจำกัด มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.8 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริก 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 (ปริมาณเซลล์และ PHB เท่ากับ 281 และ 232 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายใน 74 ชั่วโมง) แต่การเจริญจะช้ากว่าที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้น 4.3 กรัมต่อลิตร เล็กน้อย จากการทดลองที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ภายใน 35 ชั่วโมงแรก ปริมาณเซลล์และ PHB จะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยขณะที่ปริมาณฟอสเฟตจะลดลงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งปริมาณฟอสเฟตประมาณ 0.4 กรัมต่อลิตร ภายหลัง 35 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์และ PHB จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่าง

รวดเร็วขณะที่ปริมาณฟอสเฟตมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก โดยที่ในระหว่างการหมักจะมีการเติมแอมโมเนียมอย่างเพียงพอ (อยู่ในช่วง 0.6 – 2.8 กรัมต่อลิตร)

1.3.2.4 ออกซิเจน

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

Luengo และคณะ (2003) พบว่าปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB เนื่องจากสภาวะออกซิเจนจำกัดเอนไซม์ซิเตรทซินเทสและไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิทิลเอนไซม์เอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอเพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส จึงมีการสะสม PHB เพราะมีปริมาณออกซิเจนภายในเซลล์จำกัด

1.3.2.5 พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ พบว่าจะเกิดได้ดีเมื่อควบคุมพีเอชที่เริ่มต้นประมาณ 7 และพบว่าเมื่อต้องการผลิตพอลิเมอร์ควรทำการควบคุม pH ไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่า pH ลดลงอยู่ในสภาวะเป็นกรดมากเกินไปเมื่อสิ้นสุดการเจริญ

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

1.3.2.6 อุณหภูมิ

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

องศาเซลเซียส (Aslim *et al*., 1998)

1.4 การสกัดแยกพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) และทำให้บริสุทธิ์

PHA จะสะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ดังนั้นการแยกพอลิเมอร์ออกมาทำได้โดยการทำให้เซลล์แตกโดยทำลายผนังเซลล์ ซึ่งในกระบวนการสกัดต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ ได้มีการตรวจสอบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของ PHA ที่แยกได้จากจุลินทรีย์หลาย ๆ สายพันธุ์ พบว่ามีค่าของมวลโมเลกุลแปรปรวนแตกต่างกันไป ซึ่งอิทธิพลที่มีผลต่อมวลโมเลกุลคือ วิธีการที่ใช้สกัดนั่นเอง วิธีการสกัดแยก PHA แบ่งได้ 3 วิธีคือ

1.4.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดแยก PHA ด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีที่ให้ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่สกัดออกมามีมวลโมเลกุลสูง การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม; เมทธิลีนคลอไรด์; 1-2 ไดคลอโรอีเธน; 1,1,2-ไตรคลอโรอีเทน หรือโพรพิลีน คาร์บอเนต เป็นต้น PHA ที่สกัดได้จากวิธีนี้มีสีขาวสามารถทำเป็นผลึกได้และมีมวลโมเลกุลสูงแต่วิธีนี้จะใช้เมื่อต้องการความบริสุทธิ์ของพอลิเมอร์สูงแต่ไม่เหมาะสมที่จะใช้ปฏิบัติในระดับอุตสาหกรรม เพราะต้องใช้สารสกัดในปริมาณมากแต่มีข้อดีคือ สกัดได้ง่าย (Lee, 1995)

1.4.2 การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์

การสกัดวิธีนี้เป็นวิธีที่ Williamson และ Wikinson (อ้างโดย Doi, 1990) ใช้ในการแยกพอลิเมอร์ชนิด PHB จากเชื้อ *Bacillus cereus* โดยย่อยสลายผนังเซลล์นาน 30-60 นาที ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ พอลิเมอร์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยล้างด้วย ไดเอทธิล อีเธอร์ หรือเมธานอลเพื่อแยกไขมันออก การใช้สภาวะในการสกัดที่มีความเป็นด่างสูงมีผลทำให้สายพอลิเมอร์ถูกทำลายมีผลต่อคุณสมบัติทางด้านพื้นผิวและมีผลต่อโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ ระยะเวลาในการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-60 นาที การใช้เวลาเกินกว่า 60 นาที อาจมีผลทำให้พอลิเมอร์ถูกทำลายได้ สำหรับการแยก PHB ให้ได้ความบริสุทธิ์ถึง 95 % พบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวก่อนทำการสกัดช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของสารที่แยกได้สูงขึ้นถึงแม้ว่าวิธีนี้จะได้รับการพัฒนาแล้วแต่ปัญหาที่เกิดจากวิธีนี้คือยากที่จะกำจัดโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่ยังเหลือติดอยู่กับพอลิเมอร์ที่สกัดได้และโซเดียมไฮโปคลอไรด์สามารถเกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน

1.4.3 การสกัดด้วยเอนไซม์

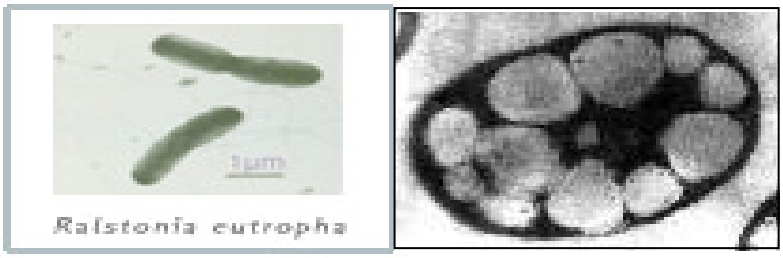
การพัฒนากระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ศึกษาโดย Homles และคณะ (1985 อ้างโดย Doi, 1990) ซึ่งเป็นกระบวนการที่นิยมใช้กันในอุตสาหกรรม เป้าหมายของกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิต PHA ในปริมาณสูงโดยดูจากเปอร์เซ็นต์น้ำหนัก PHA ต่อน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ การสกัดแยกด้วยเอนไซม์มักใช้เอนไซม์หลายชนิดรวมกัน โดยเอนไซม์ที่ใช้ต้องไม่ย่อย

กันเองเมื่อนำมาใช้รวมกันเช่น อัลคาเลส (alcalase) ฟอสฟอไลเปส (phospholipase) แลคซิเตด (lacitase) และไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นต้น (Hocking and Marchessault, 1994)

2. ลักษณะทั่วไปของ *Ralstonia eutropha*

เชื้อจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการวิจัยค้นคว้าเพื่อใช้ผลิต poly-β-hydroxybutyrate (PHB) กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดนี้มีความสามารถที่จะสะสมสาร poly -β-hydroxybutyrate ไว้ภายในเซลล์ได้มากถึงประมาณร้อยละ 80 โดยน้ำหนักเซลล์ โดยการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนง่ายๆ เช่น กลูโคส ซึ่งจากการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องของเชื้อจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* โดยการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้คงที่ 10 – 20 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้สูงถึง 164 กรัมต่อลิตร ได้สาร PHB 121 กรัมต่อลิตร ภายใน 50 ชั่วโมง หรือคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 2.42 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง (Kim *et al.,*1994) นอกจากกลูโคสแล้วยังสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ได้แก่ glucose, fructose, testosterone, phenol, benzoate, manital, pentoses, disaccharides, D-tryptophan, acetic acid, propionic acid เป็นต้น (Bowien, 2005 ; Khanna and Srivastava, 2004)

ลักษณะทั่วไปของเชื้อจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พวก Facultative มีรูปร่างเป็นแท่งกว้างประมาณ 0.5 μm ยาวประมาณ 1.8-2.6 μm (ภาพที่ 2) มีสีขาวหรือครีมและถ้าหลายๆวันจะกลายเป็นสีน้ำตาล อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส ถิ่นอาศัยคือในดินและในน้ำ (Holding and Shewan, 1974) ภาพที่ 4 แสดงการสะสมของสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ซึ่งภายหลังได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Ralstonia eutropha* (Bowien, 2005)



(A) (B)

ภาพที่ 4 ลักษณะทั่วไป (A) และการสะสมPHAภายในเซลล์ (B) ของเชื้อจุลินทรีย์ *Ralstonia eutropha*

Figure 4. General structure (A) and PHA accumulation in cell (B) of *Ralstonia eutropha*.

ที่มา : Bowien, 2005

3. กระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ (Anaerobic) เป็นวิธีที่ไม่ต้องเติมออกซิเจนหรือนิยมเรียกว่า ระบบไร้อากาศ หรือถังหมัก ระบบนี้เริ่มนิยมใช้กันแพร่หลายมากขึ้นเรื่อยๆ เพราะสามารถประหยัดพลังงานในการเติมอากาศ และยังได้พลังงานที่เกิดจากระบบไร้ออกซิเจนได้แก่ ก๊าซมีเทน (Methane gas) เป็นต้น ซึ่งเป็นก๊าซที่ใช้ในการหุงต้มทำอาหารได้ และใช้ในการต้มน้ำในหม้อต้มน้ำของโรงงานอุตสาหกรรมได้

สมการปฏิกิริยาชีวเคมีของกระบวนการแอนแอโรบิกคือ มีสารอินทรีย์ในน้ำเสียและมีจุลินรีย์อยู่ในสภาพไร้อากาศจึงเกิดปฏิกิริยาดังสมการ (1) โดยมีก๊าซมีแทนเกิดขึ้นตามปริมาณของสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสียทั่วไป

$$C_aH_bO_c + \left(a - \frac{b}{4} - \frac{c}{2} \right) H_2O \longrightarrow \left(\frac{a}{2} - \frac{b}{8} - \frac{c}{4} \right) CO_2 + \left(\frac{a}{2} + \frac{b}{8} + \frac{c}{4} \right) CH_4 \qquad (1)$$

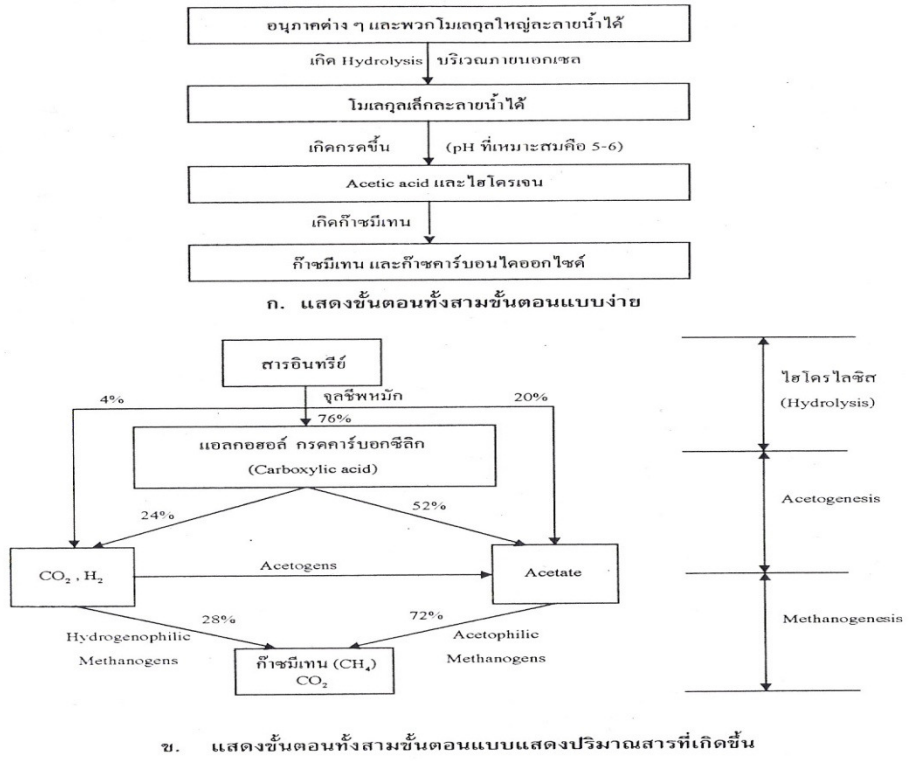
ในกระบวนการบำบัดแบบแอนแอโรบิกจะไม่มีออกซิเจนหรือไนเทรตอยู่ในระบบและจะมีแบคทีเรียชนิดแอนแอโรบิก (Anaerobic Bacteria) อยู่ในถังปฏิกิริยา โดยแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถอยู่ในสภาพมีออกซิเจนหรือมีไนเตรตได้ ซึ่งกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบแอนแอโรบิกสามารถแบ่งออกได้สามขั้นตอนหลัก ๆ ได้แก่

1. ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาการแตกตัวที่มีน้ำเข้ามาเกี่ยวข้องคือเป็นขั้นตอนที่เอนไซม์จากจุลินทรีย์จะทำการเปลี่ยนหรือย่อยโมเลกุลใหญ่ ๆ ที่ไม่ละลายน้ำไปเป็นโมเลกุลขนาดต่าง ๆ ที่ละลายน้ำได้

2. การสร้างกรด (Acid formation) และ Acetogenesis เป็นกระบวนการที่แบคทีเรียเป็นตัวสร้างกรดอินทรีย์ โดยกรดที่มีความสำคัญมากคือ กรดอะซิติก ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างมีเทน นอกจากนี้ในขั้นตอนนี้อาจมีก๊าซไข่เน่า (H_2S), CO_2 , สารละลายแอมโมเนีย และฟอสเฟตออกมาด้วย

3. การสร้างมีเทน (Methane Formation) และ Methanogenesis เป็นการที่แบคทีเรียเป็นตัวสลายกรดอินทรีย์เป็นก๊าซมีเทนในกระบวนการบำบัดแบบแอนแอโรบิก

จากที่ได้กล่าวข้างต้นสามารถแสดงแผนภาพของการเกิดทั้งสามขั้นตอนดังแสดงไว้ในภาพที่ 5ก ซึ่งจะแสดงทั้งในรูปสามขั้นตอนแบบง่าย ภาพที่ 5ข แสดงปริมาณของสารที่เกิดขึ้นด้วย



ภาพที่ 5 การย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบแอนแอโรบิก

Figure 5. Organic digestion in anaerobic wastewater treatment.

ที่มา : เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์ (2543)

4. การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ

พอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สามารถจำแนกได้ 4 จำพวกคือ 1) พอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ 2) พอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์และสามารถย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ เช่น พีเอชบี (PHB, poly-β-hydrozxybutyrate) พีเอชบี/พีเอชวี (PHB/PHV, polyhydroxyvalarate) และพอลิแซคคาไรด์พวก พูลลูแรล (pullulan) 3) พอลิเมอร์ที่ได้จากการดัดแปลงพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พีเอล (PL, polylactide) พีจี (PG, polyglycolide) และพีซีเอล (PCL, polycaprolactone) และ 4) พอลิเมอร์ผสมของพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Kang *et al*.,1996)

ในธรรมชาตินั้นพอลิเมอร์สังเคราะห์ทั่วไปไม่สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้โดยง่าย แต่กรณีของ PHA ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพประเภท แอลิฟาทิก-พอลิเอสเทอร์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ในสายโซ่ของโมเลกุล จึงทำให้สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในสภาพธรรมชาติ การย่อยสลายทางชีวภาพของ PHA เกิดขึ้นได้ทั้งในดินและในทะเล จากปฏิกิริยาการสลายพอลิเมอร์

ที่เรียกว่า ดีพอลิเมอไรเซชัน จากการทำงานของเอนไซม์นอกเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในสภาพธรรมชาติแวดล้อม เช่น ไลโซไซม์ ดีพอลิเมอเรส และไฮโดรเลส เป็นต้น โดยมอนอเมอร์และไดเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายดังกล่าวก็จะกลายเป็นแหล่งอาหารประเภทสารอาหารคาร์บอนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในระบบนิเวศน์ได้ ส่วนอัตราการย่อยสลายพอลิเมอร์จะเร็วหรือช้านั้น มักขึ้นกับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่บริเวณผิวหน้าของ PHA จากการรายงานของ Lee และ Yu (1997) พบว่า ในสภาวะไร้ออกซิเจนในระบบการบำบัดน้ำทิ้งชุมชน สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพหนา 1 มิลลิเมตร ได้ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ ขณะที่ในสภาวะมีอากาศสามารถย่อยพลาสติกชีวภาพได้ต่ำกว่าประมาณ 14 เท่า

การย่อยสลายของฟิล์มหรือพลาสติก โดยทั่วไปมักเกิดขึ้นด้วยวิธีการที่สำคัญ 2 วิธี คือ การย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) และการย่อยสลายด้วยแสง (photodegradation)

4.1 การย่อยสลายทางชีวภาพ

การย่อยสลายทางชีวภาพเกิดจากการที่ฟิล์มหรือพลาสติก ที่ประกอบด้วยสารอินทรีย์ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งสารอาหารของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโตสามารถผลิตเอมไซม์ที่ไปทำลายสายของคาร์บอนในพอลิเมอร์ (Emsley, 1991 ; อัฉราวดี สัตยพานิช, 2536) ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของฟิล์ม ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการคือ อุณหภูมิ ความชื้น พีเอช ชนิดของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นหรือจุลินทรีย์ คุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่าง ระยะเวลาในการย่อยสลาย และวิธีการในการย่อยสลาย (Emsley, 1991; Huang, 1989) นอกจากนั้นยังพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นฟิล์มตามรายงานของ Huang (1989) คือ

- หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ ระบบทางชีวภาพสามารถย่อยสลายฟิล์มโดยการไฮโดรไลซิสหรือออกซิเดชัน ดังนั้นฟิล์มจึงต้องมีหมู่ฟังก์ชันในสายของพอลิเมอร์ที่จะสามารถย่อยหรือออกซิไดซ์ ได้

- ตำแหน่งที่เหมาะสมบนสายของพอลิเมอร์ การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์สายของพอลิเมอร์ต้องมีตำแหน่งที่ทำให้ active site ของเอนไซม์เข้าไปจับได้

- ลักษณะของพอลิเมอร์ โดยพอลิเมอร์ควรมีลักษณะที่ทำให้เอนไซม์เข้าไปทำงานได้ง่าย เช่น พอลิเมอร์ที่มีความขุ่นสูง การย่อยสลายก็จะสูงด้วย

- การเติมสารที่เติมเข้าไปในการผลิตฟิล์มมีผลต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของฟิล์ม เช่น การเติมพลาสติไซเซอร์ จะทำให้อัตราการย่อยสลายเพิ่มขึ้น แต่การเติมสารที่ไปทำลายจุลินทรีย์จะลดอัตราการย่อยสลาย

- การเกิดออกซิเดชัน การเกิดออกซิเดชันอาจช่วยส่งเสริมการย่อยสลายทางชีวภาพ Whelan (1994) ได้กล่าวถึงการเกิดออกซิเดชั่นของพอลิเมอร์หมายถึงการย่อยสลาย โดยการออกซิเดชั่น

(oxidative degradation) ซึ่งเกิดจากการกระทำของออกซิเจน และเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ โดยทั่วไปสิ่งแรกที่จะเปลี่ยนคือสี การเกิดออกซิเดชันอาจมีผลต่อคุณสมบัติทางกล และคุณสมบัติอื่นๆ ของฟิล์ม แม้ว่าจะยังไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสี

4.2 การย่อยสลายด้วยแสง

ฟิล์มหรือพลาสติกที่สามารถย่อยสลายด้วยแสง เนื่องจากมีการเติมสารที่สามารถดูดซับแสงลงไปในฟิล์ม สารดังกล่าวจะไปจับที่แกนกลางของพอลิเมอร์ เมื่อได้รับแสง สารดังกล่าวจะดูดซับแสงแล้วมีพลังงานมากพอที่จะไปจับโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ใช้ผลิตฟิล์ม การเข้ามาของพลังงานจำนวนมากมีผลไปทำลายพันธะทางเคมีของพอลิเมอร์การแตกหักของสายพอลิเมอร์ทำให้ฟิล์มมีความกรอบ และเกิดการย่อยสลาย (Emsley, 1991)