บทที่ 1

บทนำ

ด้วยความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี และการลดลงของทรัพยากรทำให้มนุษย์พยายามผลิตวัสดุสังเคราะห์เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมและด้านอื่นๆ ซึ่งในแต่ละปีก็ยังมีการสังเคราะห์วัสดุใหม่ๆขึ้นมาตลอดเวลา เมื่อมีการใช้มากขึ้นวัสดุสังเคราะห์เหล่านี้จึงกลายเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม พลาสติกเป็นวัสดุสังเคราะห์ชนิดหนึ่งที่ใช้แทนวัสดุอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกมีสมบัติพิเศษที่ดีกว่าวัสดุอื่นๆ คือมีความเหนียว ยืดหยุ่น สามารถทนต่อกรด-ด่างและสารเคมีอื่นๆ รวมทั้งมีความทนทาน ราคาไม่แพง และสามารถออกแบบให้มีรูปแบบหลากหลายเพื่อประโยชน์ในการใช้งาน โดยมีกระบวนการผลิตที่สะดวกและรวดเร็ว แต่คุณสมบัติที่ดีดังกล่าวนี้กลับทำให้เกิดผลเสียต่อระบบนิเวศน์ เนื่องจากพลาสติกเหล่านี้ได้สะสมในสิ่งแวดล้อม และเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากพลาสติกดังกล่าวไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ หรือต้องใช้เวลานานมากในการย่อยสลาย (Lee และคณะ, 1991) ความทนทานต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของพลาสติกเหล่านี้เนื่องมาจากสมบัติของพลาสติกสังเคราะห์มีองค์ประกอบเป็นธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนซึ่งมีความเฉื่อยต่อปฏิกิริยา จึงไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้ นอกจากนี้พลาสติกยังมีสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ รวมถึงพื้นที่ผิวสัมผัสที่น้อยแต่น้ำหนักโมเลกุลที่สูงของพลาสติกจึงเป็นปัญหาในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (Narayan, 1993) ในปัจจุบันได้จำแนกวิธีที่การใช้กำจัดขยะพลาสติกดังนี้

1.การเผา (incineration) หลายประเทศในยุโรปได้นำพลาสติกที่ใช้แล้วมาเผาเพื่อให้พลังงานในการผลิตกระแสไฟฟ้าหรือการนำมาอบยาสูบ แต่ยังคงสร้างปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถ ควบคุมควันหรือเขม่าที่เกิดจากการเผาไหม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีอันตราย จำเป็นต้องมีระบบควบคุมความปลอดภัย และเสียค่าใช้จ่ายสูง (Evans และSikdar,1990; Huffman และKeller,1973)

2.การถมที่(land filling) เป็นวิธีการกำจัดขยะพลาสติกโดยธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพต่ำและเป็นการแก้ปัญหาในระยะสั้น เนื่องจากปริมาณขยะที่เพิ่มขึ้นจนไม่สามารถหาพื้นที่มารองรับได้หมดในอนาคต(Huffman และKeller, 1973)

3.การนำกลับมาใช้ใหม่(recycling) มีข้อจำกัดในการใช้งานคือ พลาสติกที่ใช้แล้วมีสิ่งสกปรกตกค้างอยู่ ทำให้พลาสติกที่นำกลับมาใช้ใหม่ต้องใช้งานที่ไม่เกี่ยวข้องกับการบริโภคโดยตรง เช่น ใช้ทำถังน้ำ ถุงขยะ กะละมัง เป็นต้น(Evans และSikdar,1990) และขั้นตอนในการแยกขยะพลาสติกชนิดต่างๆออกจากกันรวมถึงการแยกสารเติมแต่งออกจากพลาสติกทำได้ยาก เนื่องจากความหลากหลายของชนิดพลาสติกที่ถูกดัดแปลง ทำให้ยากต่อ

การแยกประเภทของพลาสติกเพื่อเข้าสู่กระบวนการนำกลับมาใช้ใหม่ ระบบที่ใช้ในการแยกประเภทพลาสติกที่ใช้ในปัจจุบันในยุโรป คือ การระบุองค์ประกอบของพลาสติกที่ใช้ในแต่ละชนิดเพื่อให้เครื่องคอมพิวเตอร์จำแนกชนิดและติดบาร์โค้ดลงบนผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำให้ง่ายต่อการแยกประเภท (Nicholson,1994) อย่างไรก็ตามข้อเสียของวิธีการนี้คือพลาสติกที่นำกลับมาใช้ใหม่จะเปลี่ยนแปลงสมบัติของพลาสติก มีผลให้ลักษณะทางเคมีที่ดีหลายประการลดลง เช่น การผ่านความร้อนจากกระบวนการผลิตมาแล้วในครั้งแรก เมื่อนำมาผ่านกระบวนการนำกลับมาใช้ใหม่จะไหม้ได้ง่าย ก้นถุงพลาสติกจะผนึกติดกันยากขึ้น และอายุการใช้งานของพลาสติกจะสั้นลงด้วย(Evans และSikdar,1990; Leaversuch และคณะ, 1987)

จากปัญหาปริมาณขยะที่เพิ่มขึ้นโดยลำดับดังที่ทราบกันดีโดยทั่วไป ทำให้นักวิทยาศาสตร์มีความสนใจที่จะหาวัสดุหรือพลาสติกชนิดใหม่ๆ ที่มีลักษณะที่ดีมีการปรับปรุงให้เหมาะสมต่อประโยชน์ใช้งานและง่ายต่อการกำจัดไปพร้อมกัน วัสดุที่น่าสนใจคือ พลาสติกที่ย่อยสลายได้ (degradable plastic) ที่มีสมบัติของพลาสติกที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน แต่สามารถถูกย่อยสลายได้ และผลจากการย่อยสลายไม่มีสารที่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม ดังเช่นสารพิษที่เกิดจากการย่อยสลายพลาสติกสังเคราะห์ ที่ทำให้เกิดมลภาวะหรือสารตกค้างในน้ำหรือบริเวณใกล้เคียง (Narayan, 1993) พลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

1.พลาสติกที่มีการสลายตัวโดยแสง (photodegradable plastic) พลาสติกชนิดนี้มีกลุ่มคาร์บอนิลเป็นองค์ประกอบที่มีความไวต่อแสง เมื่อสัมผัสกับแสงจะเกิดการแตกตัวของกลุ่มคาร์บอนิล ซึ่งจะทำให้พลาสติกกรอบและแตกเป็นชิ้นเล็กๆ แต่ย่อยสลายได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากการย่อยขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของพลาสติก ความหนาของพลาสติก และปริมาณสารประกอบอื่นในพลาสติก ปัจจุบันพลาสติกที่สามารถทำลายโดยวิธีนี้ ได้แก่พอลิเอทธิลีน (polyethylene) หรือ PE พอลิสไตรีน (polystyrene) หรือ PS พอลิโพรพิลีน (polypropylene) หรือ PP พอลิบิวทีน (polybutene) พอลิบิวทาไดอีน(polybutadiene) พอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinyl chloride) หรือ PVC และอะซิลโลไนไตรล์-บิวทาไดเอน-สไตรีน (acylonitrile-butadiane-styrene) หรือ ABS ซึ่งได้ผสมสาร photoactivator ลงไป (Harper และ Kellar, 1972)

2.พลาสติกที่เติมสารพอลิเมอร์ธรรมชาติซึ่งย่อยสลายได้ เป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่มีการเติมพอลิเมอร์ที่ถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ได้แก่ แป้งชนิดต่างๆ เช่น แป้งข้าวโพด (corn starch) และสารเติมแต่งอื่นๆ (ถ้าเติมแป้งแล้ว จะเรียกว่า thermoplastic starch) เพื่อให้จุลินทรีย์ในดินซึ่งอยู่ในที่ที่มีความชื้น

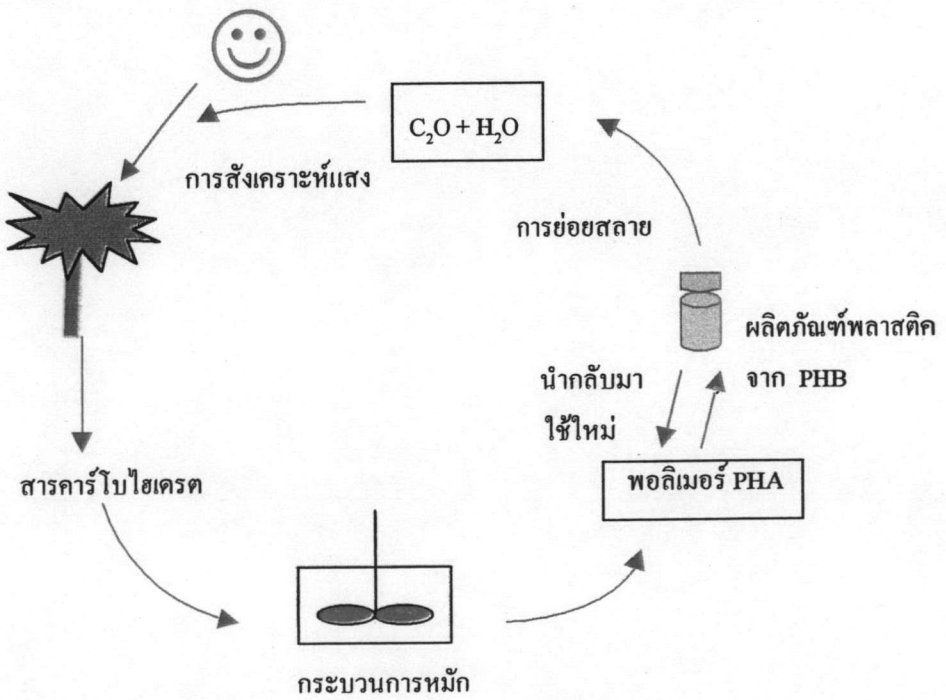
หรือในน้ำ ย่อยสลายอนุภาคสารดังกล่าว ทำให้พลาสติกมีความพรุนมากขึ้น ช่วยในการทำลายร่างแหของแผ่นพลาสติกต่อไป (Evans และ Sikdar, 1990)

3.พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) ได้แก่ เทอร์โมพลาสติกชนิดพอลิเอสเทอร์ (polyester) ซึ่งเป็นพลาสติกที่สลายตัวด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในธรรมชาติไปย่อยหมู่เอสเทอร์ชนิดอะลิฟาติกของพลาสติก และได้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อระบบนิเวศน์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งพลาสติกชนิดนี้ถูกสร้างและสะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด เป็นกลุ่มสารที่เรียกว่า PHA หรือพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates) (Brandl และคณะ, 1990)

พลาสติกที่ผลิตจากแบคทีเรียเป็นกลุ่มพอลิเอสเทอร์ ได้แก่ PHA เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต หรือ poly (3-hydroxybutyrate) ; P(3HB) หรือ PHB และพอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต หรือ poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); P (3HB-co-3HV) หรือ PHBV ซึ่งบริษัทซีนีคาไบโอโพรดักท์ (บริษัทในเครือไอซีไอ) ประเทศอังกฤษ ได้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นแห่งแรก มีชื่อการค้าว่า ไบโอโพล (BIOPOL) PHA เป็นพลาสติกชนิดที่สามารถถูกหลอมขึ้นรูปได้เมื่อได้รับความร้อน (thermoplastics) มีสมบัติต่างๆ ใกล้เคียงกับ PP และ PE ถึงแม้ว่า PHA นี้สามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีในการใช้งานบางอย่างได้เป็นอย่างดี แต่มีข้อเสียเปรียบในด้านต้นทุนการผลิต ซึ่งมีราคาสูงกว่าพลาสติกจากปิโตรเคมี ในปี 1998 Steinbuchel และ Fuchtenbusch รายงานว่าราคาของ PHB ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มีราคากิโลกรัมละประมาณ 5.58 ดอลลาร์สหรัฐ ซึ่งมีราคาสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งมีราคาประมาณกิโลกรัมละ 0.62-0.96 ดอลลาร์สหรัฐ จึงทำให้ยังเป็นประเด็นต้องที่ศึกษาวิจัยต่อไป อย่างไรก็ตามถ้าความต้องการในการใช้งานมากขึ้นในอนาคต รวมทั้งมีการวิจัยและพัฒนาในด้านการผลิตและสามารถทำให้ต้นทุนการผลิตลดลงได้ พลาสติกจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต หรือ PHA

PHA เป็นพอลิเมอร์ของไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (hydroxyalkanoate) หรือพอลิเอสเทอร์ ที่สร้างและสะสมโดยจุลินทรีย์บางชนิด เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนในการตอบสนองในสภาวะเครียดต่อสิ่งแวดล้อม หรือสภาวะที่ขาดความสมดุลย์ในการเจริญในขณะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ (Anderson และDawes, 1990) รวมทั้งใช้สำหรับการสร้างสปอร์ (sporulation) ใน *Bacillus* (Williamson และ Wilkinson, 1958) และการสร้างซีสต์ (encystment) ใน *Azotobacter* (Dawes และSenior, 1973) การตรวจเบื้องต้นเพื่อหา PHA ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ทำได้โดยเทคนิคการย้อมสีด้วยซูดานแบล็คบี (sudan black B) (Schlegel และคณะ, 1961) หรือไนล์บลูเอ (nile blue A) (Ostle และ Holt, 1982) PHA สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) และดีพอลิเมอเรส (depolymerase) ผลจากการย่อยสลายได้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อระบบนิเวศน์ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evans และ Sikdar, 1990 ; Brandl และคณะ, 1990 ; Lee, 1996) ดังแสดงในรูปที่ 1 นอกจากนี้ PHA ยังมีคุณสมบัติของเทอร์โมพลาสติก (thermoplastics) คือสามารถนำมาขึ้นรูปและทำให้เป็นฟิล์ม ชีท ไฟเบอร์ได้ (Brandl และคณะ 1990)



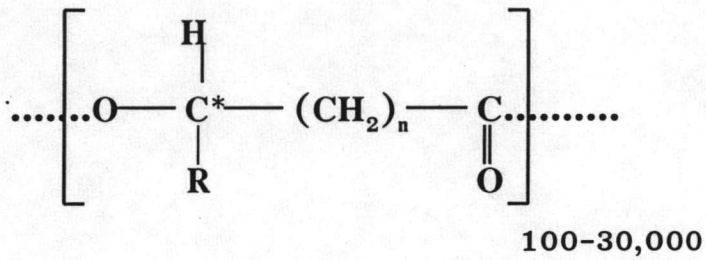
รูปที่ 1 วัฏจักรของ PHA (Lee 1996)

ตารางที่ 1 การสร้างและสะสม PHA โดยจุลินทรีย์

ชนิดจุลินทรีย์	ปริมาณ PHA สูงสุด (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้าง PHA	เอกสารอ้างอิง
Alcaligenes sp.	96.0	Fructose	Brandl และคณะ 1990
Chromatium sp.	20.0	Acetate	
Rhodobacter sp.	80.0	Acetate	
Rhodospirillum sp.	47.0	Acetate	
Beggiatia sp.	57.0	Acetate	
Leptothrix sp.	67.0	Pyruvate	
Methylosinus sp.	25.0	Methanol	
Rhizobium sp.	57.0	Methanol	
Halobacterium sp.	38.0	Glucose	
Chlorogloea sp.	10.0	Acetate, CO_2	
Spirulina sp.	6.0	CO_2	
Bacillus cereus	13.0	glucose+propionic	Ramsay และคณะ (1990)
Pseudomonas pseudoflava	43.0	glucose+propionic	
Pseudomonas cepacia	64.0	glucose+propionic	
Micrococcus halodenitrificans	21.0	glucose+propionic	
Derxia gummosa	32.0	sodium butyrate	
Chromobacterium violaceum	65.0	valerate	Steinbuchel และคณะ (1993)
Pseudomonas aeruginosa	12.0	euphobia oil	Eggink และคณะ (1992)
Rhodococcus sphaeroides	67.0	palm oil mill effluent	Hassan และคณะ (1996)
Actinobacillus sp.	43.0	glucose + alcohol	Son และ Lee (1996)
Synechococcus sp.	1.0	BG-11	Suzuki และคณะ (1996)
Burkholderia solanacearum	37.0	glucose	Renner และคณะ (1996)
Acidovorax delafieldii	4.0	sodium acetate	
Acidovorax facilis	2.0	glucose	
Paucisprillum metamorphum	28.0	sodium acetate	
Paracoccus pantotrophus	-	sucrose	Leeuwen และคณะ (1997)

โครงสร้างของ PHA

โครงสร้างของ PHA เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ ในกลุ่มไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวที่หนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวที่สอง ตรงตำแหน่งบีต้าคาร์บอน ซึ่งจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) ที่แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration การเชื่อมกันของแต่ละโมโนเมอร์เป็นแบบหางต่อหัว (isotactic) เหมือนกับ PP (Brandl และคณะ, 1990)



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ PHA (·····) คือ พันธะเอสเทอร์ และ * คือ ตำแหน่งบีต้าคาร์บอน (Lee, 1996)

เมื่อ n = 1

R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต) ; P (3HP)

R = เมทธิล (CH_3) สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ; P (3HB)

R = เอทธิล (C_2H_5) สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ; P (3HV)

R = โพรพิล (C_3H_{10}) สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) ; P (3HX)

R = เพนทิล (C_5H_{11}) สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต); P (3HO)

R = โนนิล (C_9H_{19}) สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอต) ; P (3HD)

เมื่อ n = 2

R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ; P (4HB)

R = เมทธิล (CH_3) สารนี้คือ พอลิ (4-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ; P (4HV)

เมื่อ n = 3

R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ; P (5HV)

R = เมทธิล (CH_3) สารนี้คือ พอลิ (5-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) ; P (5HX)

เมื่อ n = 4

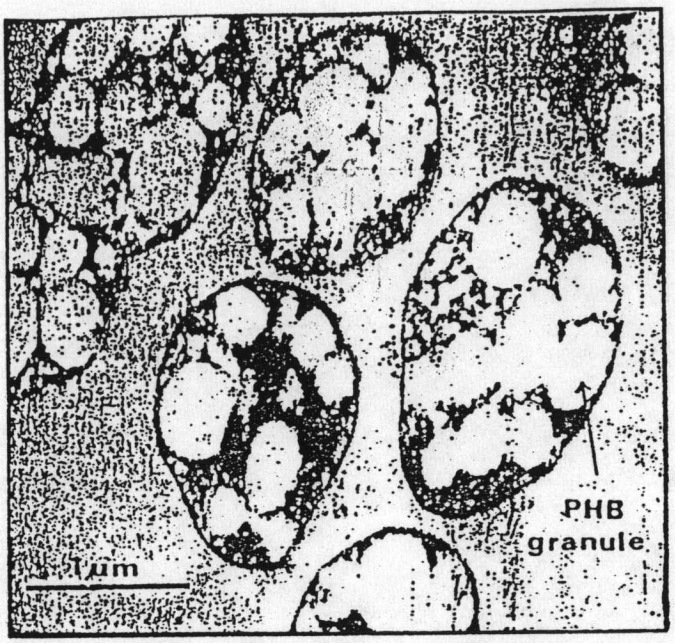
R = เฮกซิล (C_6H_{13}) สารนี้คือ พอลิ (4-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอต) ; P (4HD)

พอลิ-บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทีเรต หรือ PHB

PHB เป็นพอลิเอสเทอร์ ที่ถูกสร้างและสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์พวกเซลล์เดียวต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด (ตารางที่ 2) (Byrom, 1987) จากการศึกษาพบว่า PHB ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ เปรียบได้กับไกลโคเจนที่สะสมในสัตว์ชั้นสูง หรือแป้งที่สะสมในพืช (Bloemberger และคณะ, 1986) โดยสะสมอยู่ในแกรนูล (รูปที่ 3) ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2 ถึง 0.5 ไมโครเมตร ล้อมรอบด้วยเมมเบรน (membrane) ซึ่งประกอบด้วยไลปิด (lipid) และโปรตีน (protein) หนา 2 นาโนเมตร คิดเป็น 0.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแกรนูลตามลำดับ (Byrom, 1987) ขนาดและจำนวนของแกรนูลจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ การศึกษาขนาดและจำนวนของแกรนูลใน *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสม PHB จำนวนแกรนูลต่อเซลล์จะอยู่ในช่วง 8 ถึง 12 แกรนูล และทำให้เซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้นจาก 0.24 เป็น 0.50 ไมโครเมตร เป็นผลให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนจากยาวรี เป็นค่อนข้างกลม น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของแกรนูล (วัดโดยวิธี light scattering) เท่ากับ 5×10^9 (Ellar และคณะ, 1968) ในขณะที่น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จะอยู่ในช่วง 10^3 ถึง 10^6 ขึ้นกับชนิดของเชื้อ แต่ละแกรนูลประกอบด้วยพอลิเมอร์อย่างน้อย 1,000 สาย (Mas และคณะ, 1985) และพบว่าการสะสม PHB ของเซลล์จะหยุดที่ปริมาณหนึ่งถึงแม้ว่าเอนไซม์และซับสเตรท (substrate) ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ PHB จะยังคงมีอยู่ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องมาจากเนื้อที่ภายในเซลล์มีอยู่จำกัด (Ballard และคณะ, 1987)

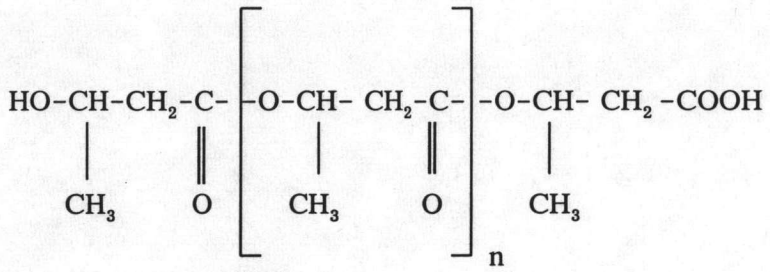
ตารางที่ 2 ตัวอย่างจีนัสของจุลินทรีย์ที่สร้างและสะสม PHB (Byrom, 1987)

Alcaligenes	*Methylobacterium*
Azotobacter	*Micrococcus*
Azospirillum	*Nocardia*
Bacillus	*Pseudomonas*
Beigerinckia	*Rhizobium*
Chlorogloea	*Rhodobacter*
Chromatium	*Rhodospirillum*
Chromobacterium	*Sphaerotilus*
Derxia	*Spirillum*
Hemophilus	*Actinomyces*
Hyphomycrobium	*Vibrio*
Lampropaedia	*Zoogloea*



รูปที่ 3 ภาพตัดของเซลล์ *A. eutrophus* จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แสดง PHB แกรนูลภายในเซลล์ (Byrom, 1987)

PHB จัดเป็นโฮโมพอลิเอสเทอร์ (homopolyester) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (3-hydroxybutyrate) จำนวน 23,000 ถึง 25,000 โมเลกุลมาต่อกัน ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 4 (Evans และ Sikdar, 1990) มีคุณสมบัติและลักษณะสำคัญดังแสดงในตารางที่ 3 (Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998) โดยมีจุดหลอมเหลวประมาณ 180°ซ น้ำหนักโมเลกุลของ PHB ในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น *Azotobacter* sp. จะอยู่ในช่วง 8×10^5 ถึง 2×10^6 *Alcaligenes eutrophus* จะอยู่ในช่วง 6×10^5 ถึง 1.2×10^6 *Pseudomonas* sp. AMI จะอยู่ในช่วง 5×10^4 ถึง 3×10^5 (Ballard และคณะ, 1987) นอกจากชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำให้ PHB มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันแล้ว พบว่าวิธีการสกัด ช่วงการเจริญของเซลล์ที่นำมาสกัด ภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ และปริมาณสารอาหารที่จำเป็นก็มีผลเช่นกัน (Dawes และ Senior, 1973 ; Ballard และคณะ, 1987 ; Berger และคณะ, 1989)



เมื่อ n = 23,000 - 25,000

รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของ PHB (Evans และSikdar, 1990)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติและลักษณะที่สำคัญของ PHB (Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998)

- เทอร์โมพลาสติก
- สลายตัวได้โดยวิธีทางชีวภาพ(biodegradable)
- ผลิตขึ้นจากทรัพยากรที่ผลิตทดแทนใหม่ได้ (renewable resources)
- ไม่เป็นพิษ(nontoxic)
- เข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatability)
- มีระดับของการเป็นพอลิเมอร์สูง
- ไม่ละลายน้ำ
- มีระดับความเป็นผลึก(degree of crystallinity)สูง
- เบี่ยงเบนระนาบแสง (optically active)
- มีความสม่ำเสมอทางด้านเคมีสเตอริโอของหน่วยซ้ำ (isotactic)
- พิโซอิเลคตริก (piezoelectric)

การค้นพบ PHB

มีการค้นพบ PHB ซึ่งสกัดแยกได้จากเชื้อ *Bacillus megaterium* เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1926 โดย Lemoigne ซึ่งต่อมา Forsyth และคณะ (1958) ได้รายงานการพบ PHB ในจุลินทรีย์กลุ่ม *Azotobacter* และกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ในปีเดียวกัน Williamson และ

Wilkinson รายงานการแยกเมตาโครมาติก แกรนูล (metachromatic granules) หรือ โวลูติน แกรนูล (volutin granules) ซึ่งเป็นสารพอลิฟอสเฟต (polyphosphate) และ PHB ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ที่จุลินทรีย์สร้างและสะสมขึ้นเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ออกจากกันในเชื้อ *Bacillus megaterium* ด้วยการย้อมสี ซูดานแบล็คบี ต่อมาในปี 1960 Harrington และ Kallo ศึกษาถึงการพบ PHB ในเซลล์ของ *Pseudomanas methanica* ที่ผ่านการสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม และสารไฮโปคลอไรต์ โดยการย้อมติดสีซูดานแบล็คบี ในปี 1961 Merrick และ Doudoroff ยืนยันการพบ PHB จากการย้อมสีซูดานแบล็คบี โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสต์ (phase-contrast microscope) ซึ่งนอกจากสี ซูดานแบล็คบีแล้ว ยังพบว่าสีไนล์บลูเอ สามารถย้อม PHB ได้เช่นกัน (Ostle และ Holt, 1982) อย่างไรก็ตาม สีทั้งสองเป็นสีย้อมที่ไม่จำเพาะในการทำปฏิกิริยา และจะย้อมได้ไม่เฉพาะ PHB แต่สามารถย้อมแกรนูลไขมันอื่นได้ด้วย ดังนั้นการรายงานการตรวจหา PHB จึงต้องใช้วิธีทางเคมีสนับสนุนด้วย (Rhee และคณะ, 1993) ในปี 1974 Wallen และ Rohwedder ได้รายงานถึงการพบเฮทเทอโรพอลิเมอร์ ที่ประกอบด้วย 3HB และ 3HV เป็นองค์ประกอบหลัก และมี 3HV และ 3HH เป็นส่วนน้อย จากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนบำบัดน้ำเสีย (activated sludge) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Findlay และ White (1983) ที่พบเฮทเทอโรพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย 3HB และ 3HV เป็นองค์ประกอบหลักในเซลล์จุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนจากทะเล (marine sediments) และพบว่า *Bacillus megaterium* สามารถสร้างเฮทเทอโรพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยของ 3HB 95 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 3HO 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 3HH (3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต) 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในปีเดียวกัน Desmet และคณะพบว่า *Pseudomonas oleovorans* เมื่อเลี้ยงด้วย n-octane จะสะสม แกรนูลเหมือนกับ PHB แต่แตกต่างกันที่สูตรทางเคมี คือได้สารที่มีสูตรเป็น $C_8H_{14}O_{12}$ ขณะที่ PHB มีสูตรทางเคมีเป็น $C_4H_6O_2$ ต่อมาในปี ค.ศ.1985 Holmes และคณะพบว่า *A. eutrophus* NCIMB สามารถสร้าง โคพอลิเมอร์ ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ 3HB และ 3HV มาต่อกัน เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส และโพรพิโอเนต เป็นแหล่งคาร์บอน ในปี ค.ศ.1986 Odham และคณะรายงานการพบเฮทเทอโรพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย HB HH และ HO จากตะกอนบำบัดน้ำเสีย

สมบัติของเฮทเทอโรพอลิเมอร์จะแตกต่างจาก PHBซึ่งเป็นโฮโมพอลิเมอร์คือมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า PHB กล่าวคือ เฮทเทอโรพอลิเมอร์มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 97 ถึง 100°ซ ในขณะที่PHB จะมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 160 ถึง 180°ซ และเฮทเทอโรพอลิเมอร์ดังกล่าวสามารถละลายได้ในเอทธานอลร้อน ส่วน PHB ไม่สามารถละลายได้ (ตารางที่ 4) (Wallen และ Rohwedder, 1974)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางกายภาพของ PHA และ PHB (Wallen และ Rohwedder, 1974)

PHA	PHB
ของแข็งสีขาว ละลายในคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนด้วยอีเธอร์ จุดหลอมเหลว 97 ถึง 100° ซ ละลายในเอทธานอลร้อน เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก เป็นเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีที่มี คาร์บอน 4 5 และ 6 อะตอม	ของแข็งสีขาว ละลายในคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนด้วยอีเธอร์ จุดหลอมเหลว 160 ถึง 180° ซ ไม่ละลายในเอทธานอลร้อน เป็นฟิลม์เมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก เป็นโฮโมพอลิเมอร์ประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีที่มี คาร์บอน 4 อะตอม

ทางด้านสรีรวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตPHB ปี ค.ศ. 1958 Williamson และ Wilkinson ได้รายงานถึงการสร้างสปอร์ (sporulation) ที่มีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB ในเชื้อ *Bacillus* ในปี ค.ศ.1966 Stevenson และ Socolofsky พบว่าการผลิต PHB และการเข้าสู่ระยะซีสต์ (cyst) ของ *Azotobacter* มีความสัมพันธ์กันโดย PHB จะเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างซีสต์ (encystment) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dawes และ Senior (1973) ที่ได้รายงานถึงการใช้ PHB กับการสร้างซีสต์ของเชื้อนี้ว่าปริมาณPHBของ Azotobacter ที่สังเคราะห์และสะสมได้จะลดลงเมื่อเชื้อนี้เข้าสู่ระยะการสร้างซีสต์

ในปัจจุบันยังมีคณะผู้วิจัยอีกหลายกลุ่มที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างและสะสม PHB ของ จุลินทรีย์ต่างชนิดกัน โดยกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน (Kim และคณะ, 1994 ; Taidi และคณะ, 1994 ; Beaulieu และคณะ, 1995 ; Lee และคณะ, 1995 ; Kato และคณะ, 1996 ; Suzuki และคณะ, 1996 ; Kusaka และคณะ, 1997 ; Page และคณะ, 1997 ;Wang และLee, 1997 ; Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998)

สมบัติทางกายภาพ และเคมีของ PHB

มีผู้ให้ความสนใจ และมีผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับPHBเป็นจำนวนมากเนื่องจาก PHB มีสมบัติดีกว่า PP ในด้านของน้ำหนักโมเลกุล จุดหลอมเหลว ระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) ความสามารถในการต้านแรงดึง (tensile strength) และมีความสามารถในการต้านแสงอุลตราไวโอเลตตามธรรมชาติได้ดีกว่า แต่มีข้อด้อยกว่าคือ PHB จะทนต่อตัวทำละลายได้น้อยกว่า และตามลักษณะทางกายภาพแล้ว PHB มีลักษณะแข็งและเปราะกว่า PP (King, 1982 ; Holmes, 1985 ; Odham และคณะ, 1986 ; Bloembergen, 1987) ดังได้แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางเคมี และทางกายภาพระหว่าง PHB และ PP ในตารางที่ 5 (Evans และ Sikdar, 1990 ; Brandl และคณะ, 1990)

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของ PP และ PHB (Evans และ Sikdar, 1990 ;Brandl และคณะ, 1990)

คุณสมบัติ	PP	PHB
จุดหลอมเหลว ($^{\circ}$ ซ)	171-186	171-182
ความสามารถเป็นผลึก(crystallinity) (%)	65-70	65-80
ความหนาแน่น (g/cm^3)	0.95-0.94	1.23-1.25
น้ำหนักโมเลกุล ($x10^5$)	2.2-7	1-8
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	5-12	2.2-3
ความแข็ง (flexurul modulus) (Gpa)	1.7	3.5-4
ความสามารถในการต้านแรงดึง (tensile strength) (Mpa)	39	40
ความสามารถในการขยายตัว (extension to break)(%)	400	6-8
ความทนทานต่อแสงอุลตราไวโอเลต (UV resistance)	ไม่ดี	ดี
ความทนทานต่อตัวทำละลาย (solvent resistance)	ดี	ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน (oxygen permeability) ($cm^3\ m^{-2}\ atm^{-1}\ d^{-1}$)	1700	45

ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* และแบคทีเรียบางชนิด

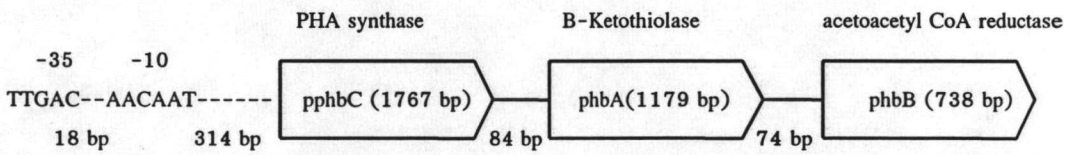
การสังเคราะห์และสะสม PHB ของจุลินทรีย์เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพที่สารอาหารขาดความสมดุลย์โดยมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ และมีการจำกัดสารอาหารบางชนิด ได้แก่ ไนโตรเจน ออกซิเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส หรือแมกเนเซียม (Byrom, 1994) นอกจากความเข้มข้นของสารอาหาร ปัจจัยอื่นก็มีผลต่อปริมาณพอลิเมอร์ของเซลล์ ได้แก่ อัตราการเจริญซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราการละลายของออกซิเจน และภาวะของการเลี้ยงเชื้อ ช่วงอายุเชื้อที่เก็บเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณพอลิเมอร์ (Haywood, 1958) อายุของเชื้อสามารถทำให้เกิดการแปรผันของปริมาณไขมันภายในเซลล์มาก โดยเชื้อที่มีอายุมากจะมีอัตราส่วนของเชื้อที่ตายอยู่มากและเกิดเซลล์แตก (autolysis) ทำให้องค์ประกอบของไขมันเกิดการเปลี่ยนแปลงยากแก่การตรวจหา PHB (Asselineau, 1966) Steinbuchel และ Schlegel (1989) พบว่าเมื่อเลี้ยง *A. eutrophus* สายพันธุ์กลายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแลคเตท กลูโคเนต หรือ ฟรักโตส แต่จำกัดปริมาณของแอมโมเนียม ซัลเฟต ฟอสเฟต โปแตสเซียม หรือ แมกเนเซียม อย่างใดอย่างหนึ่งพบว่ามีผลให้การสร้างและสะสม PHB เพิ่มขึ้น ในปี 1992 Akiyama และคณะ รายงานว่า *Alcaligenes sp.* AK 201 มีความสามารถสร้างและสะสม PHA จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กรดอัลคาโนอิค (n-alkanoic acid) ที่มีจำนวนคาร์บอน 2-22 อะตอม น้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ และไขมันสัตว์ โดยพบว่าเมื่อใช้กรดอัลคาโนอิคที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ น้ำมันพืชและไขมันสัตว์ จุลินทรีย์จะมีการสร้างและสะสม PHB แต่เมื่อใช้กรดอัลคาโนอิคที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคี่จุลินทรีย์สามารถสะสม P(3HB-co-3HV) ได้ Page (1992) รายงานถึงความสามารถในการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของธาตุไนโตรเจนที่ซับซ้อน (complex nitrogen) ได้แก่ fish peptone ในการสร้างและสะสม PHB ของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ซึ่งเลี้ยงแบบ batch culture โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและ corn syrup ปริมาณ PHB ที่ได้เท่ากับ 75 และ77 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ Steinbuchel และ คณะ (1992) พบว่าเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สามารถสังเคราะห์ P(3HB) เมื่อใช้ฟรักโตส กลูโคเนต โพรพิโอเนต หรือ เฮกซะโนเอต เป็นแหล่งคาร์บอน ต่อมาในปี 1993 Steinbuchel และคณะ รายงานถึงการใช้ กลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB โดยเชื้อ *Chromobacterium violaceum* DSM 30191 Eggink และคณะ (1993) รายงานว่า *A. eutrophus* สายพันธุ์กลายยังสามารถใช้กรดโอเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้ 32.5 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 60 ชั่วโมงในการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องและสามารถใช้น้ำมันพืช รวมทั้งกรดไขมันพันธะยาวในการผลิต PHA ได้ Rhee และคณะ (1993) รายงานว่า *Acinetobacter sp.* สามารถสร้างและ

สะสม PHB เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนและจำกัดปริมาณซัลเฟต และสามารถผลิต P(3HV) เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน Lee และ Chang (1994) รายงานว่า PHB จะถูกสะสมในปริมาณน้อยในสูตรอาหาร defined medium เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร complex medium จึงมีการศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีสูตรซับซ้อน และได้ผลว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีสูตรซับซ้อนในปริมาณน้อย ทำให้มีการสะสม PHB เพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า นอกจากนี้ได้มีรายงานโดยผู้วิจัยหลายกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าการสะสม PHB เพิ่มขึ้น เมื่อเติมกรดอะมิโนหลายชนิด (Mizutani และคณะ 1986 ; Ramirez และ Bentley (1993) Lee และคณะ (1995) ศึกษาถึงผลของกรดอะมิโนที่มีต่อการสร้างและสะสม PHB โดย recombinant *Escherichia coli* พบว่าเมื่อเติมกรดอะมิโนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิต PHB จะทำให้เชื้อสามารถสร้างและสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังได้รายงานว่าการเติมกรดโอเลอิกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB จะส่งเสริมให้เชื้อมีการสร้างและสะสม PHB ได้มากขึ้น ในปี 1995 Beaulieu และคณะได้พบว่า *A. eutrophus* มีการสร้างและสะสม PHB จากกากน้ำตาล และแอมโมเนียมซัลเฟตโดยปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ขึ้นอยู่กับปริมาณกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต ในกากน้ำตาลประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น แหล่งเกลือแร่ต่าง ๆ (trace elements) และวิตามิน เช่น ไทมีน ไรโบฟลาวิน ไพริดอกซิน และนิโคตินาไมด์ เป็นต้น ซึ่งเป็น growth factor และมีผลต่อการสร้าง PHB ในปี 1995 Martineztoledo และคณะ พบว่า *Azotobacter chroococcum* สามารถใช้น้ำเสียที่มีอะเพคติน (apectin) เป็นองค์ประกอบจากโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ Hassan และคณะ (1996) รายงานว่า *Rhodobacter sphaeroides* สามารถสร้างและสะสม PHA ได้จากน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์ม (palm oil mill effluent : POME) ซึ่งมีกระบวนการผลิต 2 ขั้นตอน ดังนี้ เริ่มจากนำ palm oil sludge มาทำการหมักในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic treatment) ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 ได้กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก ในขั้นนี้ถ้าพีเอช ต่ำกว่า 4 พบว่าเกิดกรดฟอร์มิกขึ้นด้วย ซึ่งทำให้ปริมาณ PHA ลดลง เนื่องจากกรดฟอร์มิกไม่สามารถเปลี่ยนเป็นไพรูเวทได้ (อะซิติลโคเอได้จากไพรูเวท) ต่อจากนั้น *R. sphaeroides* จึงใช้กรดทั้งสองชนิดเพื่อผลิต PHA ซึ่งได้ผลผลิต PHA เท่ากับ 0.50 กรัมต่อกรัมของกรด และได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักกรด Kim และคณะ (1996) ได้รายงานว่าการสร้างและสะสม PHB โดยเชื้อ *A. eutrophus* จะเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติม ไพรูเวต หรือ ลิวซีนลงไปในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียว ในปีเดียวกัน Jang และRogers พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes sp.* SH-69 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมกรดเลวูลินิก (levulinic acid) 0.5 กรัมต่อลิตรจะทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและสะ PHB ได้เพิ่มมากขึ้น Cromwick และคณะ (1996) รายงานว่า *Pseudomonas oleovorans*

P. ressinvorans *P. putida* และ *P. citronellolis* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากไขมันวัว (tallow) (ชนิดที่มี free fatty acids และ triglyceride เป็นองค์ประกอบ)ได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 18 15 19 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ โดยเฉพาะ *P. oleovorans* สามารถใช้ไขมันวัวที่ไม่ต้องย่อยสลายก่อน สามารถผลิต PHA ได้เท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และสายของพอลิเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 4-12 อะตอม แต่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยคาร์บอน 8 และ 10 อะตอม มีรายงานว่า *P. putida* สามารถใช้น้ำมันจากเปลือกเมล็ดปาล์ม (palm kernel oil) ในรูปของ saponified palm kernel oil (SPKO) กรดลอริก (lauric) กรดไมริสติก (myristic) และ กรดโอเลอิก ผลิต PHA ที่มีโมโนเมอร์เป็น n-alkanoate มีจำนวนคาร์บอนใน พอลิเมอร์เท่ากับ 6 - 14 อะตอม แต่ส่วนใหญ่มีจำนวนคาร์บอน 8 อะตอม นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHA ทีมีสมบัติใกล้เคียงกัน ยกเว้นเมื่อใช้กรดโอเลอิกพบว่าได้ปริมาณ PHA สูงกว่า และพอลิเมอร์มีความเหนียวมากกว่า(Ton และคณะ, 1997)

<u>ชีววิทยาระดับโมเลกุลของการสังเคราะห์ PHA ใน *A. eutrophus*</u>

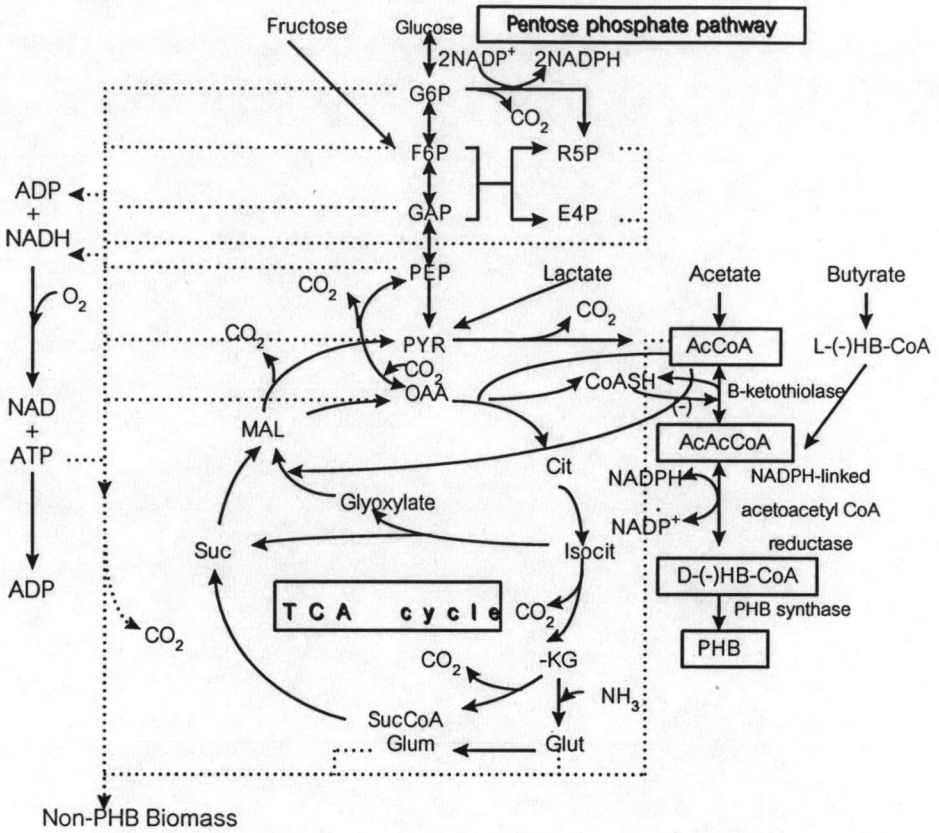
การสังเคราะห์ PHA ใน *A. eutrophus* มีการควบคุมเป็นแบบโอเปอรอนเดี่ยว (single operon) ที่ประกอบด้วยยีนส์โครงสร้าง (structural genes) คือ phb C-A-B ซึ่งแต่ละยีนส์ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ พีเอชเอ ซินเทส (PHA synthase), บีต้า-คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) และ เอ็นเอดีพีเอช-ดีเพนเดนท์ อะเซโตอะเซติลโคเอรีดักเทส (NADPH-dependent acetoacetyl - CoA reductase) ตามลำดับ



รูปที่ 5 โครงสร้างของ Single operon ที่ควบคุมการสังเคราะห์ PHA ใน *A. eutrophus* (Peoples และ Sinskey, 1989 ; Steinbuchel และคณะ, 1992)

วิถีการสังเคราะห์ PHB

ในปี 1973 นักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่มคือ Dawes และ Senior กับ Oeding และ Schlegel ได้สรุปว่าอะเซติลโคเอ (acetyl CoA) เป็นสารตั้งต้นของวิถีการสังเคราะห์ PHB Oeding และ Schlegel ได้ศึกษาวิถีการสังเคราะห์ PHB และความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์(Kreb's cycle) และรายงานว่าการที่อะเซติลโคเอจะถูกออกซิไดซ์เข้าสู่วัฏจักรของเครปส์หรือเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB นั้นขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมภายนอก กล่าวคือเมื่อมีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและมีการจำกัดปริมาณสารบางอย่างได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกเนเซียม และซัลเฟอร์ ในภาวะนี้จะส่งผลไปยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH ที่เกิดขึ้นในระบบการขนส่งอิเล็คตรอน (electron transport system) เป็นผลให้อัตราส่วนของ NADH ต่อ NAD เพิ่มสูงขึ้นและส่งผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซิเตรท ซินเทส (citrate syntase) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการรวมตัวระหว่าง ออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) กับอะเซติลโคเอได้เป็นซิเตรท และมีการปล่อยโคเอนไซม์อิสระออกมา เมื่อเอนไซม์นี้หยุดทำงานปริมาณโคเอนไซม์เออิสระจะลดลง เป็นผลให้เอนไซม์บีตา-คีโตไธโอเลส ซึ่งปกติจะถูกยับยั้งโดยโคเอนไซม์เออิสระสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ตามปกติโดยเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวกันของ อะเซติลโคเอ ไปเป็นอะเซโตอะเซติลโคเอ และเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB ในที่สุด และนอกจากนี้ยังได้ศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ในหลอดทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของโคเอนไซม์เออิสระ 0.5 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นี้ได้ 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Haywood และคณะ (1989) ได้ศึกษาเอนไซม์เอ็นเอดีพีเอช ดีเพนเดนท์ อะเซโตอะเซติลโคเอ รีดักเทสใน *A. eutrophus* แล้วรายงานว่าเอนไซม์นี้เป็นคอนสทิทิวทีฟ เอนไซม์ (constitutive enzyme) Doi และคณะ (1992) ศึกษาการควบคุมการสังเคราะห์ PHB โดย*A. eutrophus* ซึ่งใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเอนไซม์ที่เป็นกุญแจสำคัญที่ควบคุมการสังเคราะห์ PHB คือเอ็นเอดีพีเอช ดีเพน เดนท์ อะเซโตอะเซติลโคเอ รีดักเทส เนื่องจากเมื่อกรดอินทรีย์ถูกเมตาโบไลซ์จะให้อะเซโตอะเซติลโคเอ ดังนั้นวิถีการสังเคราะห์ PHB จึงไม่ผ่านปฏิกิริยาของเอนไซม์บีตา-คีโตไธโอเลส



รูปที่ 6 วิถีการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes sp.* เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน (Doi, 1990; Shi, 1997)

ในปี 1990 Doi ได้รายงานว่าวิถีการสังเคราะห์ PHB ในเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ประกอบด้วย 3 ปฏิกิริยา ซึ่งมีเอนไซม์เกี่ยวข้อง 3 ชนิดด้วยกัน โดยปฏิกิริยาแรกเป็นการรวมตัวกันของอะเซติลโคเอ 2 โมเลกุล ภายใต้การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์บีต้า-คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase หรือ acetyl-CoA acetyltransferase) จากปฏิกิริยานี้จะได้อะเซโตอะเซติลโคเอ และมีการปล่อยโคเอนไซม์เออิสระออกมา 1 โมเลกุล ปฏิกิริยาที่สอง เป็นปฏิกิริยารีดิวส์อะเซโตอะเซติลโคเอ ไปเป็นดี-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอ (D(-) hydroxybutyryl-CoA) โดยการทำงานของเอนไซม์ เอนเอดีพีเอช ดีเพนเดนท์ อะเซโตอะเซติลโคเอ รีดักเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวที่สองของวิถีการสังเคราะห์ PHB การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ NADPH เป็นโคเอนไซม์ และNADPH ที่เป็นโคเอนไซม์นี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway หรือ phosphogluconate pathway) (Lehninger , 1993) สองปฏิกิริยาแรกในการสังเคราะห์ PHB เป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดย้อนกลับได้ (reversible reaction) ปฏิกิริยาสุดท้ายเป็นก

สังเคราะห์ PHB ขึ้นจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ (polymerization) ของดี-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอ โดยการทำงานของเอนไซม์พอลิเมอเรส หรือ PHB ซินเทส (polymerase หรือ PHB synthase) โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์นี้เป็นปฏิกิริยาที่ไม่สามารถเกิดย้อนกลับได้ (irreversible reaction) (รูปที่ 6)

ในปี 1995 Mansfield และคณะ ได้ศึกษาถึงการควบคุมวิถีการสังเคราะห์PHB *ในA. eutrophus* โดยได้แบ่งภาวะในการเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ภาวะคือ ภาวะที่หนึ่งเลี้ยงเชื้อในสภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจนเพื่อส่งเสริมให้เชื้อสังเคราะห์และสะสมPHB ภาวะที่สองเลี้ยงเชื้อในสภาวะจำกัดปริมาณคาร์บอนเพื่อยับยั้งไม่ให้เชื้อสังเคราะห์และสะสมPHB และได้ทำการศึกษาระดับปริมาณของโคเอนไซม์เอเมตาโบไลซ์ ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ในการสังเคราะห์PHB จากเชื้อที่เลี้ยงทั้งสองภาวะพบว่าระดับของโคเอนไซม์เออิสระของเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจนซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.13±0.04 ไมโครโมลต่อกรัมต่อกรัมชีวมวลส่วนที่เหลือ (residual biomass) ซึ่งจะต่ำกว่าระดับของโคเอนไซม์เออิสระของเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่จำกัดปริมาณคาร์บอนซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.42±0.11 ไมโครโมลต่อกรัมชีวมวลส่วนที่เหลือถึง 3 เท่า นอกจากนี้ยังได้รายงานการศึกษาระดับปริมาณของอะเซโตอะเซติลโคเอ 3-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอ ปริมาณPHBเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และรายงานว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนและเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่จำกัดปริมาณคาร์บอนมีระดับปริมาณของอะเซโตอะเซติลโคเอใกล้เคียงกันโดยมีค่าเท่ากับ 0.05±0.01 และ0.06±0.01 ไมโครโมลต่อกรัมชีวมวลส่วนที่เหลือตามลำดับ เนื่องจากปริมาณโคเอนไซม์เออิสะเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจะยับยั้งปฏิกิริยาขั้นแรกในการสังเคราะห์PHBได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนระดับปริมาณของ 3-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอ และเปอร์เซ็นต์PHBต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจนนั้นสามารถวัดระดับ 3-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอได้ 0.03±0.01 ไมโครโมลต่อกรัมชีวมวลส่วนที่เหลือ และมีปริมาณPHB 47.2±5.50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงในภาวะจำกัดปริมาณคาร์บอนไม่สามารถวัดระดับของ 3-ไฮ ดรอกซีบิวทีริลโคเอของเซลล์ได้ แต่สามารถหาปริมาณPHB ได้ 0.34±0.08 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากผลการทดลองทั้งหมด Mansfield และคณะสรุปว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์PHBมีสองปฏิกิริยาด้วยกัน ปฏิกิริยาแรกคือปฏิกิริยาของเอนไซม์บีตา-คีโตไธโอเลส ซึ่งถูกยับยั้งโดยโคเอนไซม์อิสระ ปฏิกิริยาที่สองคือปฏิกิริยาการรีดิวซ์อะเซโตอะเซติลโคเอไปเป็น 3-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอ โดยการทำงานของเอนไซม์เอ็นเอดีพีเอช ดีเพนเดนท์อะเซโตอะเซติลโคเอ รีดักเทสซึ่งเป็นอีกปฏิกิริยาหนึ่งที่ควบคุมการสังเคราะห์ PHB ในสภาวะที่จำกัดปริมาณคาร์บอน Shi และคณะ (1997) รายงานว่าการยับยั้งปฏิกิริยาชีวเคมีในการสังเคราะห์กรดอะมิโนจะทำให้ปริมาณ NADPH ในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นผลให้การสังเคราะห์ PHB เพิ่มขึ้นด้วย

แนวทางการนำ PHA ไปใช้ประโยชน์

1. การใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ และด้านเภสัชกรรม

วัตถุประสงค์ของการนำ PHA มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์นั้น เนื่องจาก PHA มีคุณสมบัติสามารถถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์เอสเทอเรส (Holmes, 1988 อ้างถึงใน Anderson และ Dawes, 1990) รวมทั้งคุณสมบัติที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (Galgut และคณะ, 1991 อ้างถึงใน Gogolewski และคณะ, 1993) Reusch และคณะ [1992 อ้างถึงใน Lee, (1996) รายงานว่า ดี(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต เป็นสารมัธยันต์ของการเมตาโบไลซ์ (intermediate metabolite) ในสัตว์ชั้นสูง โดยตรวจพบ ดี(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำความยาวประมาณ 100-200 โมโนเมอร์ ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเป็นองค์ประกอบของ ion channel บริเวณเซลล์เมมเบรน ในร่างกายมนุษย์จะตรวจพบ ดี(-)-3-) ไฮดรอกซีบิวทีเรตปริมาณค่อนข้างมากในส่วนพลาสมา (plasma) ของเลือด ดังนั้นการปลูกถ่าย (implant) วัสดุทางชีวภาพ ที่ผลิตจาก PHB ใน ร่างกายมนุษย์ จึงไม่ทำให้เกิดภาวะการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม ดังนั้นจึงได้มีการนำPHA มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆที่ใช้ในทางการแพทย์และทางเภสัชกรรม เช่น

1.1 วัสดุสิ้นเปลืองในงานด้านศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม เข็มเย็บแผล ไหมเย็บแผล ผ้าซับเลือด และผ้าสมานแผล เป็นต้น

1.2 วัสดุเพื่อการบำบัดรักษาโรค ได้แก่ แคปซูลบรรจุยาหรือวัคซีนที่ต้องการให้ตัวยาค่อย ๆ ถูกปล่อยออกมาปริมาณน้อย ๆ เป็นระยะเวลานาน ใช้ทำกระดูกเทียมโดยอาศัยสมบัติเป็น piezoelectric ของ PHA ซึ่งคล้ายกับสมบัติที่มีในกระดูกธรรมชาติ จึงใช้เป็นแผ่นยึดกระดูก จะมีผลต่อการสร้างกระดูกใหม่ขึ้นมาทดแทน

2. การใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมและปศุสัตว์ (Eggink และคณะ, 1992 ; Lee, 1996)

2.1 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุปุ๋ย ฮอร์โมน growth factors ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช แคปซูลจะค่อย ๆ สลายทีละน้อยโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินพร้อมกับสารที่บรรจุข้างในถูกปล่อยออกมา ทำให้สารดังกล่าวคงอยู่ในดินหรือตำแหน่งที่ต้องการใช้งานได้เป็นเวลานาน จึงเป็นการช่วยประหยัด แรงงาน เวลา และลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังใช้ทำเป็นผ้าพลาสติกคลุมดินรักษาความชื้น ซึ่งเมื่อหมดเวลาการใช้งานจะค่อย ๆ ถูกย่อยสลายไปโดยธรรมชาติ

2.2 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยารักษาโรคและวัคซีนต่าง ๆ ในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันโรคระบาด ยาถ่ายพยาธิ และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นานเป็นต้น

3. การใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์ หรือส่วนประกอบของอุปกรณ์บางประเภท (Eggink และคณะ, 1992 ; Lee, 1996)

ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก PHA เช่น ผ้าอนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป ด้ามมีดโกน ขวดแชมพู ขวดใส่น้ำมันเครื่องรถยนต์ ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป และแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร เป็นต้น

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ในปัจจุบันพลาสติกสังเคราะห์ที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ได้ก่อให้เกิดปัญหาด้านมลภาวะต่อระบบนิเวศน์ และมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นทุกขณะ ดังนั้นการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะลดปัญหาดังกล่าวได้ พอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น PHA ได้รับความสนใจในการนำมาทดแทนการใช้พลาสติกในปัจจุบันเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่สร้างจากจุลินทรีย์บางชนิดและสามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีเอนไซม์เอสเทอเรส และดีพอลิเมอเรส เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานต่อไป ผลจากการย่อยสลายได้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อระบบนิเวศน์ ด้วยคุณสมบัติที่ดีดังกล่าวจึงก่อให้เกิดงานวิจัยและพัฒนาเพื่อศึกษาถึงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHA หาภาวะการเลี้ยงเชื้อและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เพื่อสังเคราะห์และสะสม PHA จากเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งเพิ่มการสังเคราะห์ PHA ให้ได้มากขึ้น

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเติมสารซัพพลีเมนต์ (supplement) บางชนิดต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 เพื่อเพิ่มการผลิต PHB ให้ได้ปริมาณมากขึ้น โดยเป็นงานวิจัยที่ได้ศึกษามาอย่างต่อเนื่อง เริ่มจาก อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ได้คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตPHB ได้แก่ *Alcaligenes sp.* A-04 โดยได้ศึกษาชนิดและสมบัติทางกายภาพและเคมีของพอลิเอสเทอร์ที่ผลิตได้ พบว่าเป็น PHB การเลี้ยงในระดับขวดเขย่าพบว่า mineral salt medium เมื่อได้ปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม PHB เพิ่มขึ้นเป็น 47 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากเมื่อเริ่มต้นศึกษาซึ่งเชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสมPHB ได้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ชนัญ ผลประไพ(2537) ได้ศึกษาต่อมาโดยใช้อาหารสูตรปรับปรุงของอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ มาใช้ในการผลิต PHB โดยศึกษาการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร และหาภาวะที่เหมาะสมโดยการเลี้ยงในระดับถังหมัก ซึ่งเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน คือ เลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณเซลล์มากก่อนแล้วจึงถ่ายเชื้อลงอาหารเพื่อการผลิต PHB โดยการศึกษาภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในถังหมัก พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นเป็น 85 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (คิดเป็น 7.54 กรัมต่อลิตร)

อย่างไรก็ตาม ผลผลิตของ PHB ที่ได้ยังจัดว่าอยู่ในเกณฑ์ไม่สูงพอสำหรับการผลิตในระดับขยายส่วน ดังนั้นยังต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มการสังเคราะห์และสะสม PHB ภายในเซลล์ให้สูงขึ้น การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเติมซับพลีเมนต์บางชนิดที่อาจมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 ในระดับขวดเขย่า โดยศึกษาหาซับพลีเมนต์ที่มีผลยับยั้งการเมตาโบไลท์ของอะเซติลโคเอ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของวิถีการ

สังเคราะห์ PHB เพื่อไม่ให้เข้าสู่วิถีเมตาโบไลซ์อื่น ๆ ได้แก่การสังเคราะห์กรดไขมัน การสังเคราะห์ซิเตรท และการสังเคราะห์อะซิเตท เป็นต้น (Anderson และ Dawes, 1990) ในขณะเดียวกันการคาตาโบไลซ์(catabolized) ของซัพพลีเมนต์ที่ศึกษาอาจส่งเสริมให้มีการเพิ่มปริมาณอะเซติลโคเอภายในเซลล์ของ *Alcaligenes sp.* A-04 เพื่อเป็นการรักษาปริมาณของอะเซติลโคเอให้เพียงพอต่อการสังเคราะห์ PHB และศึกษาหาซัพพลีเมนต์ที่จะสามารถรักษาปริมาณของ NADPH ซึ่งเป็นโคเอนไซม์สำคัญในปฏิกิริยาของการรีดิวซ์อะเซโตอะเซติลโคเอไปเป็น ดี-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ 2 ในการสังเคราะห์ PHB โคเอนไซม์ NADPH นี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากวิถีเพนโทสฟอสเฟต และพบว่า NADPH ถูกใช้มากในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโน และในขณะเดียวกันกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดกลูโคนิกอาจส่งเสริมในการสังเคราะห์ NADPH เพิ่มขึ้น เนื่องจาก 6-ฟอสโฟกลูโคเนต ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ในวิถีเพนโทสฟอสเฟตนั้น คืออนุพันธ์ของกรดกลูโคนิก (Lehninger, 1993) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเกิดแนวความคิดที่จะศึกษาผลของซัพพลีเมนต์ ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโน กรดไขมัน และกรดอินทรีย์บางชนิดที่อาจมีต่อวิถีการสังเคราะห์ PHB ภายใต้สมมติฐานว่าเมื่อเติมซัพพลีเมนต์เหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB อาจจะสามารถรักษาปริมาณอะเซติลโคเอ และ / หรือ NADPH ของเชื้อไว้ให้มากพอสำหรับการสังเคราะห์ PHB นอกจากนี้การคาตาโบไลซ์ของซัพพลีเมนต์เหล่านี้อาจส่งเสริมให้มีการเพิ่มปริมาณของอะเซติลโคเอ และ/หรือ NADPH ให้เพียงพอสำหรับใช้ในวิถีการสังเคราะห์ PHB เพื่อกระตุ้นให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้ในปริมาณมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลการกระตุ้นของซัพพลีเมนต์ได้แก่ กรดอะมิโน กรดไขมัน และกรดอินทรีย์บางชนิด ที่มีต่อการสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes sp.* A-04 ซึ่งอาจมีผลต่อการเพิ่มการผลิต PHB ให้ได้ปริมาณมากขึ้น

ขั้นตอนการวิจัย

1. เตรียมกล้าเชื้อ *Alcaligenes sp.* A-04 ให้ได้ปริมาณเซลล์มากขึ้น และมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์และสะสม PHB

2. ศึกษาผลของกรดอะมิโน ได้แก่ กรดกลูตามิก กลูตามีน กรดแอสปาติก แอสปาราจีน โปรลีน ไลซีน ทรีโอนีน ซีสเตอีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จินีน และ เมทไธโอนีน ต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB

3. ศึกษาผลของกรดไขมันบางชนิด ได้แก่ กรดโอเลอิก กรดปาล์มิติก และกรดสเตียริก ต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB

4. ศึกษาผลของกรดอินทรีย์บางชนิด ได้แก่ กรดกลูโคนิก กรดมาโลนิก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก ต่อการสังเคราะห์และสะสม PHB