บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันได้มีการนำพลาสติกสังเคราะห์มาใช้ในงานด้านต่างๆมากมาย เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีความทนทาน น้ำหนักเบา ควบคุมการซึมผ่านของออกซิเจนและน้ำได้ ทนทานอุณหภูมิต่ำ เป็นต้น จึงสามารถนำไปใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิดตามความเหมาะสมต่อการใช้งาน ทั้งนี้พลาสติกที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีซึ่งเป็นพลาสติกที่มีการย่อยสลายได้ยากหรือย่อยสลายไม่ได้เลยตามธรรมชาติ (Narayan, 1994) ประกอบกับแนวโน้มความต้องการใช้พลาสติกได้ขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงส่งผลให้ขยะที่เกิดจากผลิตภัณฑ์พลาสติกใช้แล้วมีปริมาณเพิ่มขึ้นและก่อให้เกิดปัญหาในการกำจัดตามมา จากข้อมูลของกรมควบคุมมลพิษพบว่าในปี พ.ศ. 2540 ประเทศไทยมีปริมาณขยะทุกประเภทสูงถึง 37,102 ตันต่อวันหรือ 13.5 ล้านตันต่อปี ในจำนวนนี้เป็นขยะพลาสติกที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ประมาณร้อยละ 15 ส่วนปริมาณขยะพลาสติกที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ยังไม่มีตัวเลขที่ชัดเจน และการจัดการขยะพลาสติกที่ใช้กันทั่วไปมีแนวทางดังนี้ (Brandl และคณะ, 1990; สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2542)

- **วิธีการนำกลับมาใช้ใหม่** (recycling) เป็นการนำผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ใช้แล้วประเภทเทอร์โมพลาสติกกลับเข้าสู่กระบวนการแปรรูปใหม่ โดยนำกลับมาหลอมใหม่ด้วยความร้อนหรือความดัน เนื้อพลาสติกที่ได้จะมีคุณสมบัติด้อยลง หากเป็นพลาสติกประเภทเทอร์โมเซตติ้ง (thermosetting) จะหลอมเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้ยากและไม่คุ้มค่าการลงทุน สำหรับประเทศไทยนั้นการกำจัดขยะพลาสติกด้วยวิธีนี้ยังมีสัดส่วนน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณพลาสติกที่ใช้ทั้งหมด ซึ่งจากรายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อมพบว่าปริมาณการใช้พลาสติกปีหนึ่งๆ ประมาณ 1.36 ล้านตัน ในขณะที่พลาสติกใช้แล้วถูกนำมารีไซเคิลได้เพียง 182,755 ตันต่อปีเท่านั้น

- **วิธีการนำไปฝังหรือถมดิน** (landfill) เป็นวิธีการที่ประเทศไทยนิยมใช้ในการกำจัดขยะส่วนใหญ่ วิธีนี้ต้องใช้พื้นที่มาก ขยะพลาสติกที่ฝังหรือถมในดินต้องใช้ระยะเวลานานมากในการ

สลายตัวในดิน จึงเป็นอุปสรรคต่อการไหลซึมผ่านของน้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งจะมีผลทำให้สภาพของดินเปลี่ยนแปลงได้

- **วิธีการเผาทำลาย** (incineration) เป็นวิธีที่ใช้เตาเผาขยะความร้อนสูงไม่ต่ำกว่า 1,200 องศาเซลเซียส หากใช้ความร้อนไม่สูงพอจะทำให้เกิดก๊าซพิษหรือเกิดการหลอมตัวติดกับเตาเผาขยะ วิธีการนี้จึงเป็นวิธีที่ใช้เงินลงทุนสูงและยังอาจทำให้เกิดมลภาวะด้วย

การจัดการขยะพลาสติกตามวิธีที่กล่าวมามีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน โดยทั่วไปการเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมที่สุดมักคำนึงถึงสภาพของแต่ละพื้นที่และค่าใช้จ่ายเป็นหลัก อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกให้สลายตัวได้ง่ายขึ้นหรือย่อยสลายได้บางส่วน ได้แก่ การเติมสารที่ถูกย่อยสลายได้โดยธรรมชาติผสมกับพลาสติกสังเคราะห์ (additive-based plastic) การเติมสารที่ช่วยให้พลาสติกเกิดปฏิกิริยากับแสงอัลตราไวโอเลตได้ (photo activator) ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะช่วยในการกำจัดขยะพลาสติกให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สำหรับการใช้พลาสติกที่ย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradable) เป็นวิธีการหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นการย่อยสลายพลาสติกได้อย่างสมบูรณ์และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม (Brandl และคณะ, 1990; Chang และคณะ, 1994; Brandl และคณะ, 1995)

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ (degradable plastic)

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ หมายถึง พลาสติกที่ถูกออกแบบให้เปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีแล้วเสียสมบัติบางประการไปภายใต้สิ่งแวดล้อมเฉพาะ (Wool, 1994) ซึ่ง Brandl และคณะ (1995) ได้แบ่งการย่อยสลายพลาสติกออกเป็น 3 ลักษณะหลัก คือ การย่อยสลายทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ ดังนี้

การย่อยสลายพอลิเมอร์ทางด้านกายภาพ (physical degradation) แบ่งกลไกเป็น 2 ประเภท คือ ทางด้านเชิงกล (mechanical) และทางด้านความร้อน (thermal) ซึ่งกลไกทั้งสองประเภทเกิดขึ้นได้กับพอลิเมอร์ทุกชนิด

การย่อยสลายพอลิเมอร์ทางด้านเคมี (chemical degradation) แบ่งกลไกเป็น 3 ประเภท คือ 1) ปฏิกิริยาการละลาย (solubilization) เกิดกับพอลิเมอร์ที่สามารถละลายได้

2) ปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) เกิดกับพอลิเมอร์ที่สามารถถูกทำให้เกิดออกซิเดชั่นได้โดยอาศัยสารเอสเทอร์

3) ปฏิกิริยาการสลายด้วยแสง (photochemical) แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

- การใช้สารแต่งเติมที่ไวต่อแสง (photosensitive additives) ลงในพลาสติก แล้วรังสีอัลตร้าไวโอเลตในแสงจะทำปฏิกิริยาให้เกิดการย่อยสลายขึ้น เป็นผลให้น้ำหนักโมเลกุลลดลง
- การใช้สารโคพอลิเมอร์ที่ไวต่อแสง (photosensitive copolymers) ร่วมกับพลาสติกที่ใช้ทั่วไป เมื่อโคพอลิเมอร์ถูกแสงจะทำให้สายของพอลิเมอร์ขาดลง

การย่อยสลายพอลิเมอร์ทางด้านชีวภาพ (biological dedradation) แบ่งกลไกเป็น 2 ประเภท คือ

1) การย่อยสลายโดยปราศจากเชื้อ เกิดกับพอลิเมอร์ที่สามารถดูดซับน้ำได้ (resorbable polymers)

2) การย่อยสลายโดยเชื้อจุลินทรีย์ เป็นพอลิเมอร์ที่ถูกย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradable polymers) ด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์จากจุลินทรีย์

พอลิเมอร์ย่อยสลายทางชีวภาพ

พอลิเมอร์ที่ถูกย่อยสลายทางชีวภาพ หมายถึง พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายโดยปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และสาหร่าย (Wool, 1994) แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ (Brandl และคณะ, 1990; Chiellini, 1994; Wool, 1994; Brandl และคณะ, 1995)

1) **พอลิเมอร์ที่เติมสารเติมแต่งซึ่งย่อยสลายได้ทางชีวภาพ** (biodegradable additives polymers) ซึ่งอาศัยหลักการเติมสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น ข้าวโพด ข้าว แป้ง มาผสมเข้ากับพลาสติกพวกพอลิเอทิลีน (polyethylene) พอลิโพรพิลีน (polypropylene) และพอลิสไตรีน (polystyrene) ซึ่งจุลินทรีย์จะย่อยสลายแป้งทำให้พลาสติกมีความอ่อนตัวลงและพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้น จากนั้นโลหะที่มีอยู่ในดินไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับเกลือไดเปอร์ออกไซด์ซึ่งจะไปทำให้สายพอลิเมอร์สั้นลง และทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยพลาสติกได้ต่อไป

2) **พอลิเมอร์ย่อยสลายทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์** (completely biodegradable polymers) เป็นพลาสติกที่สลายตัวด้วยเอนไซม์ ซึ่งพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีอยู่หลายชนิด การค้นพบในช่วง 20 ปีที่ผ่านมานี้ ส่วนมากพบสายพอลิเมอร์ที่มีพันธะซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ เช่น เอไมด์ (amide) เอสเทอร์ (ester) ยูเรีย (urea) ยูรีเทน (urethane) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พอลิเมอร์ที่น่าสนใจที่สุดคือพอลิเอสเทอร์สายตรง เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ที่นำไปใช้งานได้ในหลากหลายวัตถุประสงค์

ชนิดของกลุ่มพอลิเอสเทอร์สายตรงที่สำคัญ ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates หรือ PHA) พอลิไกลโคเลต (polyglycolate หรือ PGA) พอลิแลคเตต (polylactate หรือ PLA) พอลิไดออกซาโนน (polydioxanone) พอลิแลกโตน (polylactone) พอลิเอสเทอร์เอไมด์ (polyester amide) พอลิมาเลต (polymalate) (Li และ Vert, 1995) ซึ่งเมื่อพิจารณาสมบัติด้านต่างๆ พบว่า พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีความเป็นไปได้มากในการนำมาใช้แทนพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Lee, 1996a)

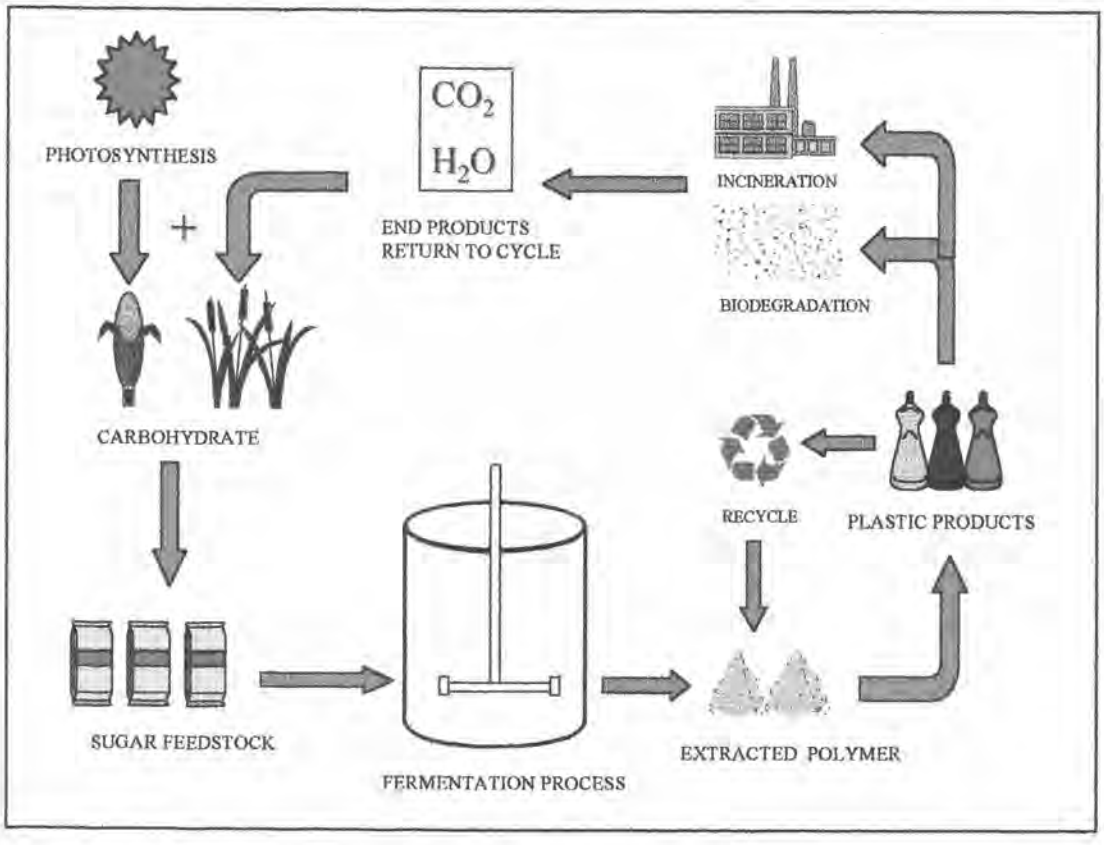
พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดหนึ่งซึ่งน่าสนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ทดแทนพลาสติกบางชนิดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน PHA เป็นพอลิเมอร์ประเภทเทอร์โมพอลิเอสเทอร์ (thermopolyester) ที่มีสมบัติคล้ายกับพอลิโพรพิลีนและพอลิเอทิลีนซึ่งเป็นพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีที่ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ส่วนใหญ่ในปัจจุบัน มีสมบัติที่ใกล้เคียงกัน เช่น จุดหลอมเหลว ความสามารถเป็นผลึก การต้านแรงดึง น้ำหนักโมเลกุล (Brandl และคณะ,1990) นอกจากนั้น PHA ยังมีระดับการเป็นพอลิเมอร์ที่สูง มีความเป็นผลึกสูง มีการเบี่ยงเบนระนาบแสง (optically active) มีความสม่ำเสมอทางด้านเคมีสเตอริโอของหน่วยซ้ำ (isotactic) ไม่ละลายในน้ำ และสามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ ซึ่งเป็นข้อเด่นของ PHA (Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998) โดยสามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ในสิ่งแวดล้อมที่มีอยู่โดยทั่วไป เช่น ในดิน น้ำจืด น้ำกร่อย น้ำทะเล ตะกอนน้ำทะเล และน้ำเสีย รวมทั้งในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยกลุ่มของแบคทีเรียจำนวนมาก รา สาหร่ายและสเตรปโตมัยซีสที่เกาะอยู่บนผิวพอลิเมอร์แล้วปล่อยเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (depolymerase) ออกมานอกเซลล์ เพื่อย่อยพอลิเมอร์ให้เป็นหน่วยโมโนเมอร์และอยู่บริเวณใกล้เคียงกับเซลล์ของจุลินทรีย์นั้น จากนั้นโมโนเมอร์จะถูกละลายแล้วดูดซึมผ่านเข้าทางผนังเซลล์ และเกิดปฏิกิริยาการเมตาบอไลซ์เปลี่ยนเป็นสารที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ พร้อมทั้งปล่อยน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาในภาวะที่มีออกซิเจน หรือปล่อยก๊าซมีเทนออกมาภายใต้ภาวะไร้อากาศได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการย่อยสลาย (Lee, 1996a; Cox, 1994) ข้อได้เปรียบอีกประการหนึ่ง คือ PHA มีโครงสร้างย่อยที่หลากหลายจึงสามารถปรับสัดส่วนของพอลิเมอร์แต่ละชนิดเพื่อให้มีคุณสมบัติเหมาะสมตามที่ต้องการได้ ทั้งยังไม่เป็นพิษและสามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatability) โดยมีรายงานเกี่ยวกับ PHA ชนิดหนึ่ง คือ ดี(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ของการเมตาโบไลซ์ (intermediate metabolite) ในสัตว์ชั้นสูง (Reusch และคณะ,

1992 อ้างถึงใน Lee, 1996a) และมีสมบัติเป็นพิโซอิเลคตริก (piezoelectric) ที่เข้ากับเนื้อเยื่อของคนได้ (Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998) นอกจากนี้วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA เป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable resource) ในขณะที่พลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีทั่วไปใช้วัตถุดิบที่ใช้แล้วหมดไปไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

วัฏจักรของ PHA

ประเด็นที่น่าสนใจในการนำ PHA มาใช้แทนพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี คือ PHA เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และผลิตได้จากกระบวนการหมักที่ใช้แหล่งสารอาหารคาร์บอนซึ่งส่วนใหญ่มาจากทรัพยากรที่ผลิตทดแทนใหม่ได้ (renewable resource) เช่น น้ำตาลซึ่งผลิตจากอ้อย ข้าวโพด หรือวัตถุดิบจากการเกษตรบางชนิด จึงทำให้การผลิตและการย่อยสลาย PHA เป็นวัฏจักรที่แตกต่างจากพลาสติกทั่วไปที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งไม่ถูกย่อยสลายและใช้วัตถุดิบประเภทฟอสซิล (fossil) ที่มีวันหมดลงได้ (William และ Peoples อ้างถึงใน Madison และ Huisman, 1999)



รูปที่ 1 วัฏจักรของ PHA (Luzier, 1992)

วัฏจักรของ PHA ดังแสดงในรูปที่ 1 เริ่มจากการผลิต PHA ซึ่งใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก โดยจุลินทรีย์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารคาร์บอนโดยอาศัยกระบวนการเมตาบอลิสมของจุลินทรีย์ แล้วสะสมพอลิเมอร์ PHA ในรูปของแกรนูลอยู่ภายใน เมื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกต่างๆแล้ว จากนั้นภายหลังการใช้งาน PHA จะถูกจัดการได้เช่นเดียวกับพลาสติกโดยทั่วไป โดยเมื่อเกิดการสลายตัวบางส่วนจะได้เป็นปุ๋ยที่มีแหล่งคาร์บอนอินทรีย์ที่อุดมสมบูรณ์ ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำ รักษาปริมาณสารอาหารในดิน และสามารถยับยั้งการเกิดโรคพืชบางชนิด เมื่อย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารอาหาร น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้นี้พืชสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์แสงของพืชเพื่อการเจริญเติบโตผลิดอกออกผลที่สามารถนำกลับไปใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเพื่อผลิต PHA อย่างเป็นวัฏจักรต่อเนื่อง (Narayan, 1994; Lee, 1996a)

การค้นพบและการวิเคราะห์ PHA

PHA ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1888 โดย Beijerink (อ้างถึงใน Braunegg, 1998) จากการสังเกตเห็นแกรนูล (granule) ซึ่งมีลักษณะเป็นรีแฟรกไทล์ บอดี (refractile bodies) ในแบคทีเรีย และในปี ค.ศ. 1925 Lemoigne (อ้างถึงใน Doi, 1990) ได้วิเคราะห์ PHA ประเภท พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly(3-hydroxybutyrate) หรือ PHB] ครั้งแรกในระหว่างการย่อยสลายตัว (autolysis) จาก *Bacillus megaterium* ด้วยวิธีการวิเคราะห์โดยน้ำหนักที่ละลายในคลอโรฟอร์มร้อน ต่อมา Williamson และ Wilkinson ในปี 1958 ได้ปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ให้มีความไว (sensitivity) มากขึ้นและย้อมสี PHA ด้วยซูดานแบล็ก บี (Sudan black B) จนกระทั่งในปี 1960 Slepecky และ Law ได้ใช้กรดซัลฟูริกและความร้อนย่อยให้ได้กรดโครโตนิกแล้ว วิเคราะห์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ในปี ค.ศ.1974 มีรายงานของ Wallen และ Rohwedder (อ้างถึงใน Doi, 1990) ว่าได้พบหน่วยโมโนเมอร์อื่นๆ นอกจาก 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เช่น 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3-hydroxy valerate) 3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต (3-hydroxyhexanoate) และ 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต (3-hydroxyoctanoate) นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาเพื่อหาวิธีวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ซึ่ง Braunegg และคณะ (1978) ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟฟีเป็นครั้งแรก ต่อมา Comeau และคณะ (1988) ได้ทำการศึกษาปรับปรุงวิธีการโครมาโตกราฟฟีให้ดียิ่งขึ้น

ชนิดของจุลินทรีย์ที่สะสม PHA

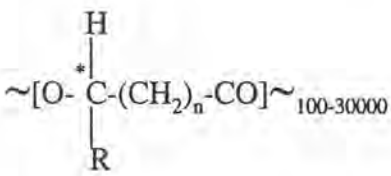
พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสม PHA ได้มีหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ราและยีสต์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สะสม PHA (Doi, 1990; Hassan และคณะ, 1996; Son และคณะ, 1996; Zuzuki และคณะ, 1996)

Acidovorax	*Gamphosphaeria*	*Photobacterium*
Acinetobacter	*Haemophilus*	*Pseudomonas*
Actinobacillus	*Halobacterium*	*Rhizobium*
Actinomycetes	*Hydrogenophaga*	*Rhodobacter*
Alcaligenes	*Hyphomicrobium*	*Rhodococcus*
Aphanothece	*Lamprocystis*	*Rhodospirillum*
Aquaspirillum	*Lampropedia*	*Sphaerotilus*
Azotobacter	*Leptothrix*	*Spirillum*
Bacillus	*Methylobacterium*	*Spirulina*
Beggiatoa	*Methylocystis*	*Streptomyces*
Beijerinckia	*Methylosinus*	*Synechococcus*
Burkladeria	*Micrococcus*	*Syntrophomonas*
Caulobacter	*Microcoleus*	*Thiobacillus*
Chlorofrexeus	*Microcystis*	*Thiocapsa*
Chlorogloea	*Moraxella*	*Thiocystis*
Chromatium	*Mycoplana*	*Thiodictyon*
Chromobacterium	*Nitrobacter*	*Thiopedia*
Clostridium	*Nitrococcus*	*Thiosphaera*
Derxia	*Nocardia*	*Vibrio*
Ectothiorhodospira	*Oceanospirillum*	*Xanthobacter*
Escherichia	*Paracoccus*	*Zoogloea*
Ferrobacillus	*Paucispirillum*	

โครงสร้างและหน้าที่ของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวแรกกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวถัดไปตรงตำแหน่งบีตาคาร์บอน ซึ่งจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) ที่แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration การต่อเชื่อมกันของแต่ละโมโนเมอร์เป็นแบบหางต่อหัวที่มีหมู่อัลคิล [R] ต่ออยู่ด้านเดียวกันของสายโซ่คาร์บอนอย่างสม่ำเสมอจึงมีความสม่ำเสมอทางด้านเคมีสเตอริโอของหน่วยซ้ำซึ่งคล้ายกับพอลิโพรพิลีน (Byrom, 1987) ดังรูปที่ 2 นอกจากพอลิเอสเทอร์สายตรงแล้วอาจมีโครงสร้างเป็นแบบพันธะคู่ แบบอะโรมาติก (aromatic) หรือแบบฮาโลจิเนต (halogenated) ได้ (Madison และ Huisman,1999)



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_7)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	; P(3HC)
	R = บิวทิล (C_4H_9)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต)	; P(3HH)
	R = เพนทิล (C_5H_{11})	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต)	; P(3HO)
	R = เฮกซิล (C_6H_{13})	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต)	; P(3HN)
	R = เฮปทิล (C_7H_{15})	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดกคาโนเอต)	; P(3HD)
	R = ออกทิล (C_8H_{17})	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีอันเดกคาโนเอต)	; P(3HUD)
	R = โนนิล (C_9H_{19})	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดกคาโนเอต)	; P(3HDD)
เมื่อ n = 2	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	; P(4HB)
เมื่อ n = 3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(5HV)

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ PHA ซึ่ง ~ คือพันธะเอสเทอร์ และ * คือตำแหน่งบีตาคาร์บอน

(Lee, 1996a; Lee, 1996b; Doi, 1990)

PHA เป็นสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการให้พลังงานภายในเซลล์ เช่นเดียวกับสารไกลโคเจนที่สะสมในสัตว์ชั้นสูง หรือแป้งที่สะสมในพืช โดยทั่วไปจุลินทรีย์มีการสะสมพลังงานภายในเซลล์อยู่ 3 รูปแบบ คือ PHA ไกลโคเจน หรือพอลิฟอสเฟต ซึ่ง PHA เป็นชนิดเดียวที่ไม่ได้ให้พลังงานในรูปเอทีพี (ATP) โดยตรง แต่มีบทบาทดังนี้ (Dawes และ Senior, 1973)

- ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งพลังงานระหว่างภาวะขาดแคลนอาหาร เพื่อใช้ในการดำรงชีพ ช่วยการควบคุมแรงดันออสโมติก รักษาระดับ pH ภายในเซลล์ ช่วยในการเคลื่อนที่ และเทิร์นโอเวอร์ (turnover) ของโปรตีนกับกรดนิวคลีอิก ทำให้การสลายตัวเอง (autolysis) และการตายในภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจนเกิดช้าลง ซึ่งพบใน *Bacillus megaterium* (Macrae และ Wilkinson, 1958) นอกจากนี้ยังช่วยให้แบคทีเรียในช่วงที่มีการเจริญคงที่ (stationary phase) มีความทนทานได้มากขึ้น เช่น ทนต่อความเย็นทันที (cold shock) ร้อนทันที (heat shock) และทนต่อความแห้งได้ดี (Postgate และ Hunter, 1962 อ้างถึงใน Dawes และ Senior, 1973) เป็นต้น

- ใช้ในการสร้างสปอร์ในสายพันธุ์ของ *Bacillus* และซีสต์ในสายพันธุ์ของ *Azotobacter* เพื่อเป็นกลไกพิเศษสำหรับช่วยให้มีชีวิตอยู่ได้ภายใต้ภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะเมื่อมีการขาดแคลนสารอาหาร (Dawes และ Senior, 1973)

- ใช้เป็นแหล่งอิเลคตรอน (electron sink) ใน Azotobacteriaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ โดยการสังเคราะห์ PHB แทนกระบวนการหายใจสำหรับออกซิเดชั่น NAD(P)H อีกครั้ง (re-oxidation of NAD(P)H) (Dawes และ Senior, 1973)

การจำแนกชนิดของ PHA

การจำแนกชนิดของ PHA สามารถแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA ออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1) โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [poly(3-hydroxybutyrate); PHB] และพอลิ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต [poly(3-hydroxyvalerate); PHV] เป็นต้น

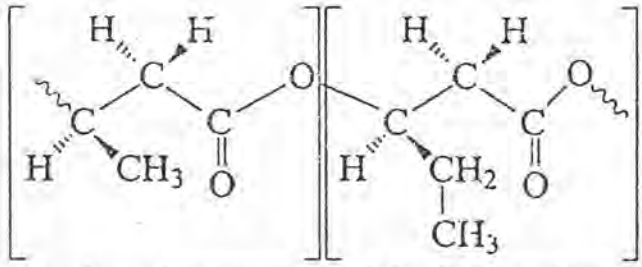
2) เฮเทอร์โรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้

- โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-

hydroxyvalerate); P(3HB-*co*-3HV) หรือ PHBV] หรือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต-โค-3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) [Poly(3-hydroxyhexanoate-*co*-3-hydroxyoctanoate); P(3HH-*co*-3HO)] เป็นต้น

- เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate-*co*-4-hydroxybutyrate); P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB)] เป็นต้น

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)



3-hydroxybutyrate–co–3-hydroxyvalerate

รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของ PHBV (Hammond และ Liggat, 1995)

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ PHBV เป็นโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) ต่อเชื่อมกับ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) ด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกกับหมู่ไฮดรอกซี โดยมีการเรียงตัวของโมโนเมอร์เป็นแบบสุ่ม แสดงลักษณะเป็นไอโซไดมอร์ฟิซึม (isodimorphism) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์สองชนิดที่คล้ายกันจึงสร้างผลึกร่วมกัน (cocrystallization) ได้ (Bluhm และคณะ, 1986) ดังรูปที่ 3 นับตั้งแต่มีการค้นพบโคพอลิเมอร์ของ PHBV และได้มีการศึกษาสมบัติต่าง ๆ พบว่า PHBV มีสมบัติที่ดีกว่า PHB ดังนี้ (Bloembergen และคณะ, 1986 และ Doi และคณะ, 1995)

สมบัติทางอุณหภูมิของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีโมโนเมอร์ของ 3HV ประกอบอยู่ด้วยมีผลให้ลดอุณหภูมิต่างๆลง ได้แก่ อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature : T_m) อุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (glass trasition temperature: T_g) และค่าความร้อนของการหลอมเหลว (heat of

fusion: ΔH_f) ได้มีการศึกษาพบว่าโคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงขึ้น ทำให้อุณหภูมิหลอมเหลวลดลงตามลำดับ เมื่อมีสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 40 โมลเปอร์เซ็นต์จะให้อุณหภูมิหลอมเหลวของพอลิเมอร์ต่ำที่สุด คือ 75 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนให้สูงขึ้นกว่านี้พบว่าอุณหภูมิหลอมเหลวเพิ่มขึ้น กล่าวคือ เมื่อมี 3HV เท่ากับ 95 โมลเปอร์เซ็นต์อุณหภูมิหลอมเหลวสูงขึ้นเป็น 108 องศาเซลเซียส ในขณะที่โฮโมพอลิเมอร์ของ PHB มีอุณหภูมิหลอมเหลวประมาณ 180 องศาเซลเซียส (Doi, 1990) การศึกษาของ Hu และคณะ (1997) ก็พบว่า สัดส่วนของ 3HV ที่เพิ่มขึ้นจะลดอุณหภูมิหลอมเหลวลงตั้งแต่ 178 จนถึง 99 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิกลาสทรานสิชันก็ลดลงจาก 4 จนถึง -16 องศาเซลเซียส ตามการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนของ 3HV จาก 9 จนถึง 95 โมลเปอร์เซ็นต์ รวมทั้งค่าความร้อนในการหลอมเหลวมีแนวโน้มลดลงในลักษณะเดียวกับอุณหภูมิหลอมเหลว โดยมีค่าต่ำที่สุดเมื่อ 3HV มีค่าอยู่ระหว่าง 20 ถึง 60 โมลเปอร์เซ็นต์ (Doi, 1990)

ระดับการเป็นผลึก (degree of crystallinity) ของ PHBV จะลดลงเมื่อสัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้นในช่วง 20 ถึง 60 โมลเปอร์เซ็นต์ (Bluhm และคณะ, 1986) จากการวิเคราะห์ด้วย NMR (nuclear magnetic resonance) ของ PHBV ที่มี 3HV ในช่วง 20 ถึง 40 โมลเปอร์เซ็นต์ ได้แสดงให้เห็นว่า 3HV ที่เกิดขึ้นในช่วงแรกจะเกิดพอลิเมอร์ที่ไม่เป็นระเบียบ หรือ เรียกว่าบริเวณอสัณฐาน (amorphous region) แทรกอยู่ในบริเวณที่เป็นผลึก (crystalline region) ของ 3HB ที่มีอยู่เดิม และเมื่อสัดส่วน 3HV สูงขึ้นอีกจะเกิดบริเวณที่เป็นผลึกจาก 3HV กลับมาแทนที่อีก จึงทำให้การลดระดับการเป็นผลึกกลับเพิ่มขึ้นเมื่อ 3HV สูงเกิน 40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Kunioka และคณะ, 1989; Doi, 1990; Bonthrone และคณะ, 1993 อ้างถึงใน Cox, 1994) ซึ่งเทอร์โมพลาสติกที่มีผลึกน้อยลงจะมีลักษณะใสขึ้น (เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์, 2540)

สมบัติเชิงกล (physical properties) ของ PHBV เปลี่ยนแปลงตามสัดส่วนของ 3HV คือ 3HV ที่เพิ่มขึ้นทำให้โคพอลิเมอร์ยืดหยุ่นขึ้นโดยดูจากค่ายังโมดูลัส (Young's modulus) ที่ลดลง ช่วยลดความแข็ง (stiffness) โดยดูจากค่าการทนแรงกระแทก (impact strength) ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งโคพอลิเมอร์จะนุ่มมากเมื่อ 3HV อยู่ในช่วง 30 ถึง 60 โมลเปอร์เซ็นต์ และการต้านแรงดึง (tensile strength) จะลดลงในช่วง 0 ถึง 25 โมลเปอร์เซ็นต์ จึงมีผลให้ความเหนียวเพิ่มขึ้น (toughness) รวมทั้งมีผลต่อแรงกด (compressive) และการทนแรงเฉือน (shear stress) ที่ทำให้ยืดหรือขาดง่าย ด้วย เช่น จากการทดสอบแรงดึงของแผ่นฟิล์มที่มี 3HV เท่ากับ 34 โมลเปอร์เซ็นต์จะได้ค่าการยืดเพิ่มขึ้นถึง 970 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเกิน 1200 เปอร์เซ็นต์เมื่อมี 3HV เท่ากับ 55 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อ 3HV สูงถึง 71 โมลเปอร์เซ็นต์โคพอลิเมอร์จะกลับมีสมบัติแข็งเปราะเหมือนโฮโมพอลิเมอร์ PHB (Holmes, 1985; Doi, 1990; Cox, 1994; Hu และคณะ, 1997) เมื่อเปรียบเทียบกับ

พลาสติกที่ใช้ทั่วไป พบว่า PHBV มีค่ายังโมดูลัสที่สูงกว่าพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density polyethylene: LDPE) และพอลิโพรพิลีน (PP) แต่มีค่าใกล้เคียงกับพอลิเอทิลีนเทอเรฟทาเลต (polyethylene terephthalate: PET) และ PHBV ที่มี 3HV ในช่วง 10 ถึง 20 โมลเปอร์เซ็นต์มีค่าการทนแรงกระแทกสูงกว่า LDPE อีกทั้ง PHBV ที่มี 3HV ในช่วง 0 ถึง 10 มีการทนแรงดึงใกล้เคียงกับ LDPE และ PP (Cox, 1994)

การย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) เป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการประยุกต์ใช้พลาสติกประเภทนี้ ซึ่งต้องพิจารณาถึงการคงตัวของพอลิเมอร์ระหว่างการใช้งานในอากาศที่มีความชื้นธรรมดาหรือในน้ำ โดยอัตราการย่อยสลายของพอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับปัจจัยของสิ่งแวดล้อม เช่น ระดับความชื้น ปริมาณสารอาหาร อุณหภูมิ pH สูตรโมเลกุลที่เหมาะสม น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นที่ต่ำ ค่าระดับการเป็นผลึกที่ต่ำ พื้นที่ผิวที่มาก อัตราการย่อยสลายของ PHBV ที่มี 3HV เท่ากับ 10 และ 24 โมลเปอร์เซ็นต์มีแนวโน้มที่เร็วกว่า PHB เนื่องจากระดับการเป็นผลึกที่ต่ำกว่า (Cox, 1994)

การทนสารเคมีและสมบัติในการซึมผ่านของโคพอลิเมอร์ PHBV พบว่า PHBV ทนสารเคมีได้ดี โดยเฉพาะทนสารไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันได้ดีที่สุด มีความเสถียรในสารละลายที่มีค่า pH ในช่วง 3 ถึง 10 สำหรับสมบัติการป้องกันโดยทั่วไป ได้แก่ สมบัติการซึมผ่านของความชื้นและออกซิเจน (Moisture Vapour Transmission Rate: MVTR และ Oxygen Transmission Rate: OTR) โดยเมื่อสัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้น อัตราการซึมผ่านของความชื้นค่อนข้างคงที่ แต่อัตราการซึมผ่านออกซิเจนจะเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าการซึมผ่านออกซิเจนใน PHBV นี้ยังต่ำกว่า LDPE PP และพอลิไวนิลคลอไรด์ (poly vinyl chloride: PVC) ส่วนอัตราการซึมผ่านของความชื้นใกล้เคียงกับ LDPE PP และ PVC (Cox, 1994; Madison และ Huisman, 1999)

กระบวนการหลอม (melting process) พบว่าโฮโมพอลิเมอร์ PHB เป็นสารที่ไม่เสถียรต่อการหลอม (melt unstable) จึงมีช่วงความสามารถในกระบวนการฉีดเข้าแม่พิมพ์ (mould) และการไหลออกมาแคบมาก (Holmes, 1988 อ้างถึงใน Doi, 1990) แต่โคพอลิเมอร์ของ PHBV มีความเสถียรด้านอุณหภูมิที่ต่ำกว่า จึงสามารถประยุกต์ใช้กับวิธีการผลิตอุปกรณ์พลาสติกโดยทั่วไป นอกจากนี้ ยังมีจุดหลอมเหลวที่ครอบคลุมในช่วงเดียวกับ PE และ PP จึงสามารถใช้ PHBV ได้ดีในกระบวนการฉีดและการเป่า รวมทั้งกระบวนการรีด (extrusion) การหล่อเม็ดพลาสติกแบบฉีด (injection moulding) การผลิตเม็ดพลาสติกแบบเป่าและรีด (extrusion blow) การอัดขึ้นรูปพลาสติกแผ่น (moulding thermoforming) การหล่อพลาสติกเหลว (cast) อย่างไรก็ดี ความ

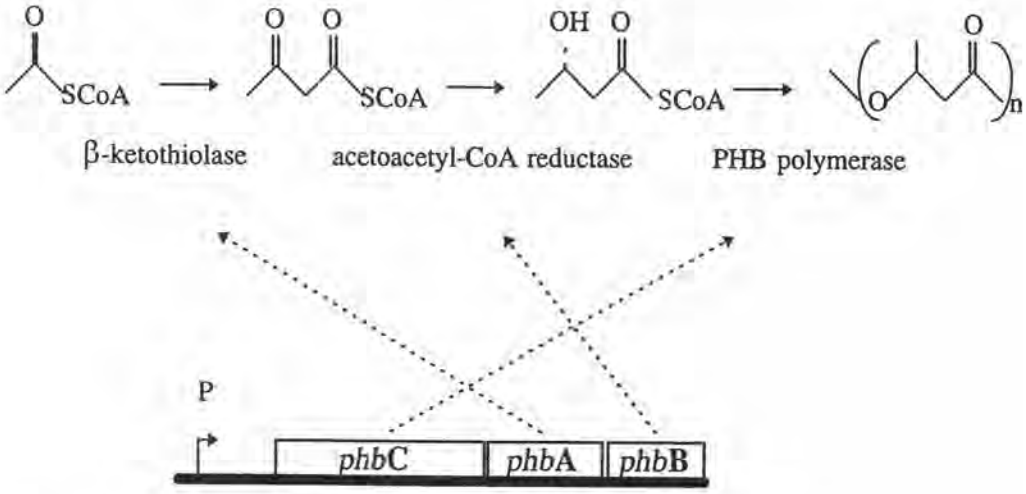
สามารถใช้ในกระบวนการฉีดเข้าไปในแม่พิมพ์เพื่อขึ้นรูปยังเป็นเพียงการทดลองฉีด โดยใช้โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV ในช่วง 0 ถึง 25 โมลเปอร์เซ็นต์ (Cox, 1994)

จากการศึกษาสมบัติด้านต่างๆและวิถีการสังเคราะห์ของโคพอลิเมอร์ PHBV ต่างๆที่ได้จากจุลินทรีย์ตามที่กล่าวข้างต้น สรุปว่า สามารถควบคุมการผลิต PHBV ได้โดยการแปรผันโครงสร้างของโมเลกุลและส่วนประกอบของโคพอลิเมอร์ ทั้งนี้สัดส่วนของ 3HV ที่แตกต่างจะส่งผลให้โคพอลิเมอร์มีสมบัติทางกายภาพ เคมี และเชิงกลแตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้ PHBV จึงเป็นโคพอลิเมอร์ที่สามารถนำมาทำวัสดุได้หลากหลายชนิดและเหมาะสมที่จะใช้ทำผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ ได้แก่ ไบโอพอล (biopol) เป็น PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 0 ถึง 30 โมลเปอร์เซ็นต์ (Nobes และคณะ, 1994 และ Johansson, 1992) แต่ทั้งนี้ถ้าโคพอลิเมอร์ PHBV มีสัดส่วนของ 3HV มากเกินไป ก็จะมีสมบัติด้านต่างๆไม่ดีดังที่ Bloembergen และคณะ (1987) รายงานว่า สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่สูงตั้งแต่ 47 ถึง 100 โมลเปอร์เซ็นต์ไม่เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์

วิถีการสังเคราะห์ PHA

มีการศึกษาวิถีการสังเคราะห์ PHB ในปี 1973 โดยนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม คือ Dawes และ Senior กับ Oeding และ Schlegel ได้สรุปว่า อะเซติลโคเอ (acetyl CoA) เป็นสารตั้งต้นของวิถีการสังเคราะห์ PHB และศึกษาถึงความเกี่ยวข้องกับสารมัธยันตร์ของวัฏจักรทีซีเอ (TCA cycle) และรายงานว่าการที่อะเซติลโคเอจะถูกออกซิไดซ์เข้าสู่วัฏจักรทีซีเอ หรือเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB นั้นขึ้นอยู่กับภาวะแวดล้อมภายนอก กล่าวคือเมื่อมีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและมีการจำกัดปริมาณธาตุบางอย่าง ได้แก่ ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟต แมกนีเซียม ฟอสเฟต โพแตสเซียม และเหล็ก (Steinbuchel และ Schelegel, 1989 อ้างถึงใน Braunegg และคณะ, 1998) ซึ่งใน *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha* เสนอโดย Osterhout และคณะ, 1998) มีการควบคุมเป็นแบบโอเปอรอนเดี่ยว (single operon) ที่ประกอบด้วยยีนส์โครงสร้าง (structural genes) คือ *phb* C-A-B ซึ่งแต่ละยีนส์ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์พีเอชบี พอลิเมอเรส หรือ ซินเทส (PHB polymerase or synthase) บีตา หรือ 3-คีโตไธโอเลส (β or 3-ketothiolase) และ อะเซโตอะเซติลโคเอรีดักเทส (acetoacetyl-CoA reductase) ตามลำดับ ดังรูปที่ 4 โดยวิถีการสังเคราะห์ PHB เริ่มต้นด้วยอะเซติลโคเอ (เกิดจากซับสเตรตที่เป็นคาร์บอนที่เหมาะสม) สอง

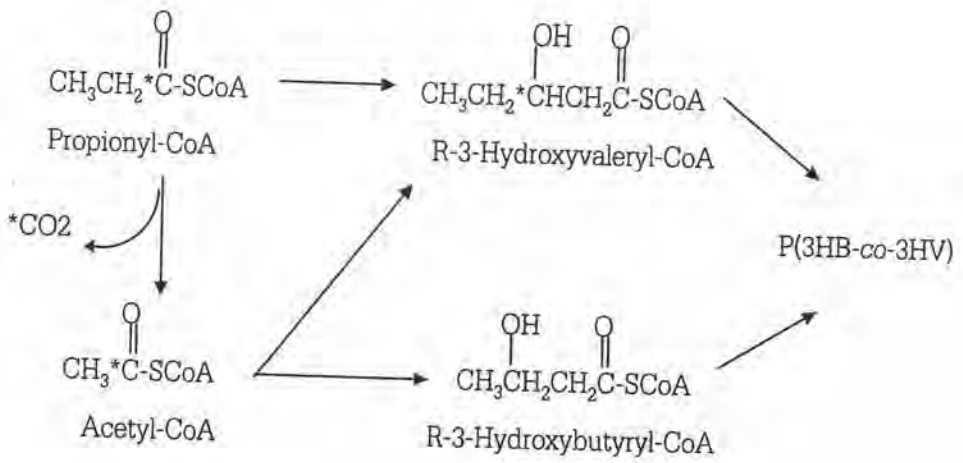
โมเลกุลรวมกันโดยเอนไซม์ บีตาคีโตไธโอเลสกลายเป็นอะเซโตอะเซติลโคเอ จากนั้นอะเซโตอะเซติลโคเอจะถูกรีดิวซ์ (reduce) เป็นดี-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA) โดยเอนไซม์อะเซโตอะเซติลโคเอรีดักเทส ต่อจากนั้นดี-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอก็ถูกพอลิเมอร์ไรซ์ (polymerize) โดยเอนไซม์พีเอชบี พอลิเมอเรส ได้เป็น PHB



รูปที่ 4 วิถีการสังเคราะห์ PHB (Madison และ Huisman, 1999)

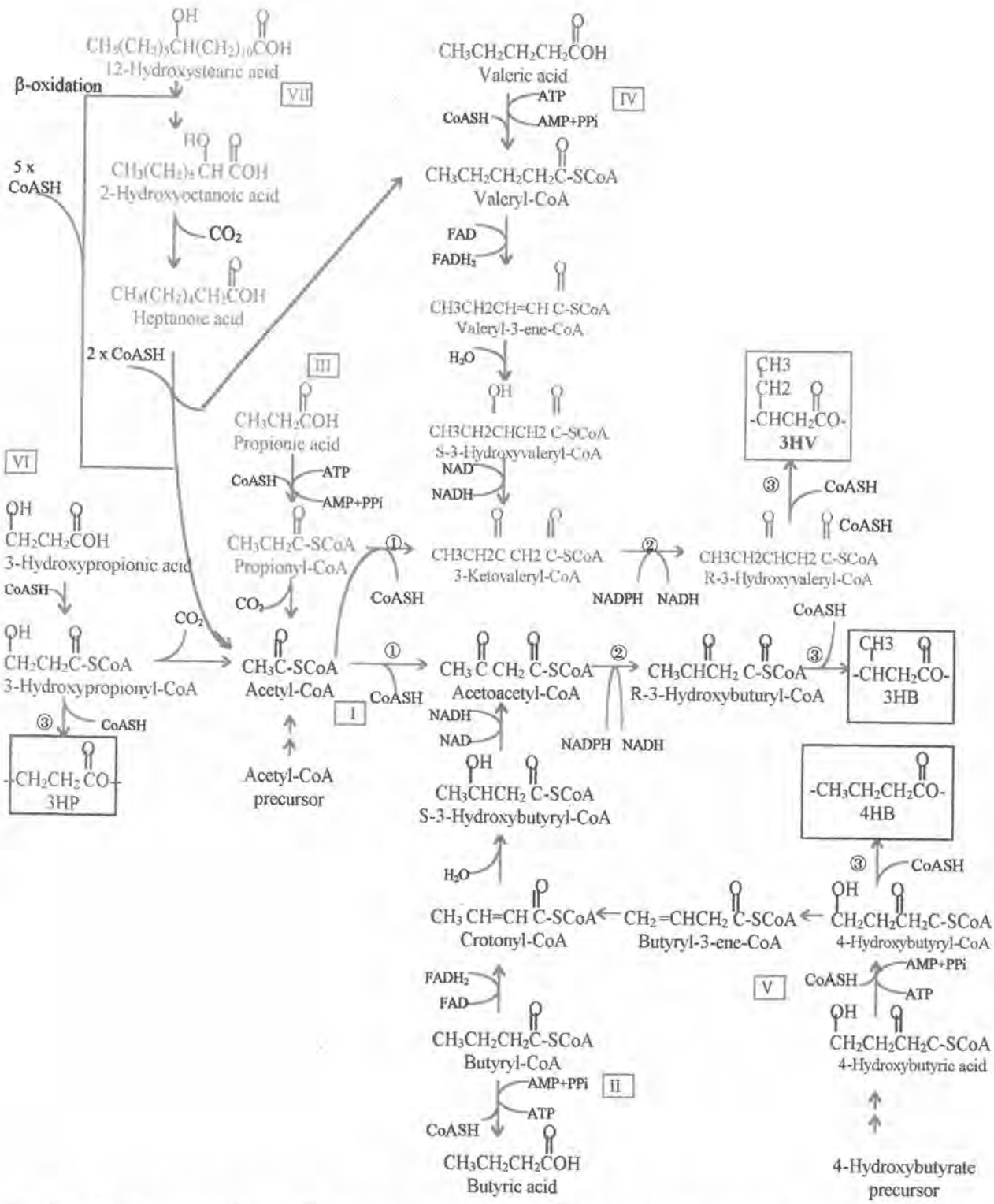
การควบคุมเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ PHB คือ บีตาคีโตไธโอเลสจะถูกยับยั้งด้วย CoA อิสระที่มีปริมาณสูงที่ได้จากอะเซทิลโคเอปล่อยออกมาหลังจากเข้าสู่วัฏจักรทีซีเอ ภายใต้ภาวะที่มีการจำกัดซับสเตรตบางชนิดเอนไซม์ซิเตรต ซินเทส (citrate synthase) จะถูกยับยั้งโดยเอ็นเอดี เอช (NADH) ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น จึงลดความเข้มข้นของโคเอ แต่วิถีการสังเคราะห์บางส่วนที่แตกต่างไป เช่น ซับสเตรตที่เป็นบิวทิเรตหรือกรดไขมันไม่ต้องการเอนไซม์บีตาคีโตไธโอเลส (Doi และคณะ, 1992)

วิถีการสังเคราะห์ PHBV ใน *Alcaligenes eutrophus* โดยการใช้โซเดียมโพรพิโอเนตเพียงอย่างเดียว ในวิถีการสังเคราะห์จากคาร์บอนอะตอมที่มีการติดฉลากกัมมันตรังสี (*C) พบว่าโพรพิโอเนตถูกเปลี่ยนเป็นโพรพิโอนิลโคเอ (propionyl-CoA) ซึ่งโพรพิโอนิลโคเอสามารถถูกเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคเอได้โดยปล่อยคาร์บอนในหมู่คาร์บอนีลออกมา ดังนั้น 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) ที่ได้มาจากปฏิกิริยาระหว่างโพรพิโอนิลโคเอร่วมกับอะเซติลโคเอ และได้ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) จากการรวมตัวกันของอะเซติลโคเอสองโมเลกุล (Doi, 1987a) ดังวิถีการสังเคราะห์รูปที่ 5



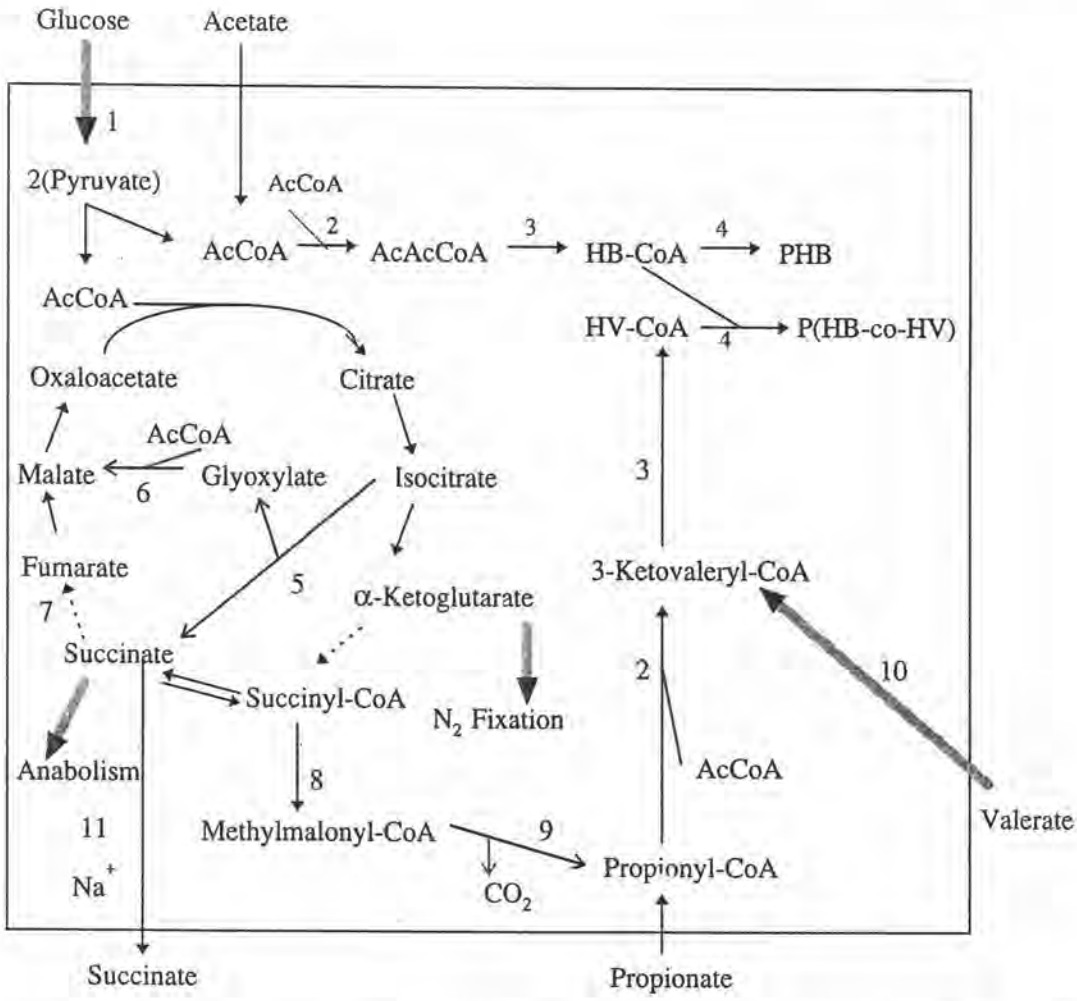
รูปที่ 5 วิถีการสังเคราะห์ของโคพอลิเอสเทอร์ ที่ประกอบด้วยหน่วยของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV)(Doi และคณะ, 1987a)

Braunegg และคณะ (1998) ได้สรุปวิถีการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ PHA ชนิดต่างๆ คือ 3HB 3HV 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (4HB) และ 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต (3HP) ดังแสดงในวิถีการสังเคราะห์รูปที่ 6 จากซับสเตรตได้หลายชนิด ซึ่งวิถีการสังเคราะห์ที่ I ได้ PHB จากอะเซทิลโคเอ และวิถีที่ III ได้ P(3HB-*co*-3HV) หรือ PHBV จากกรดโพรพิโอนิก ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ในวิถีที่ II โมโนเมอร์ของ 3HB สามารถถูกสังเคราะห์ได้โดยตรงจากกรดบิวทิริก โดยเปลี่ยนเป็นอะเซโตอะเซทิลโคเอโดยไม่ต้องอาศัยอะเซทิลโคเอ หรือเป็นการผ่านเข้ากระบวนการบีตาออกซิเดชั่น (β-oxidation) วิถีที่ IV การใช้กรดวาเลอริกเป็นซับสเตรต พบว่า สามารถใช้วาเลอริกเป็นสารตั้งต้น (precursor) สำหรับ 3-ไฮดรอกซีวาเลอริลโคเอโดยรวมเป็นพอลิเมอร์โดยผ่านทางวาเลอริลโคเอ (valeryl-CoA) แล้วเข้าบีตาออกซิเดชัน ซึ่งพบว่า *Ralstonia eutropha* และ *Alcaligenes latus* จะผลิตได้ 3HV สูงกว่าการใช้โพรพิโอนิก วิถีที่ V และ VI เป็นการสังเคราะห์ 4HB และ 3HP จากกรด 4-ไฮดรอกซีบิวทิริก และกรด 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนิก ตามลำดับ และผ่านเข้าวิถีการสังเคราะห์ 3HB ได้บางส่วนด้วย วิถีที่ VII เป็นการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV จากกรด 2-ไฮดรอกซีออกตาโนอิก หรือกรด 12-ไฮดรอกซีสเตียริก โดย *Alcaligenes* sp. AK 201 ผ่านทางกระบวนการบีตาออกซิเดชันของสารประกอบนั้นๆ ซึ่งจะปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์และกรดเฮปตะโนอิก ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคเอและวาเลอริลโคเอได้ แล้วผ่านเข้าทางวิถีที่ I เป็น 3HB และวิถีที่ IV เป็น 3HV ต่อไป



รูปที่ 6 วิถีการสังเคราะห์ PHA ใน *Ralstonia eutropha* ยกเว้นวิถี VII จาก *Alcaligenes* AK 201 เอนไซม์: ① β-ketothiolase; ② NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; ③ NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; ④ PHB synthase (Oeding และ Schlegel; Doi และคณะ; Kunioka และคณะ; Doi; Nakamura; Akiyama และ Doi; Shi และคณะ, อ้างถึงใน Braunegg และคณะ, 1998)

นอกจากนั้น Page และคณะ (1997) ได้ศึกษาการผลิต PHBV จากแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ โดย *Azotobacter salinestris* พบว่า ซับสเตรตแต่ละชนิดเลือกเข้าวิถีในการสังเคราะห์ 3HV ทั้งการนำโพรพิโอเนตไปเปลี่ยนได้โดยตรง หรือผ่านทางบีตาออกซิเดชั่นเพียงบางส่วนของวาเลอเรต ดังแสดงในวิถีการสังเคราะห์รูปที่ 7 ส่วนใน *Bacillus* ถึงแม้ว่า *Bacillus megaterium* เป็นสายพันธุ์แรกที่ถูกแยกและมีรายงานว่าสามารถสะสม PHB ได้ก็ตาม แต่วิถีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ใน *Bacillus* นั้นยังไม่สามารถจัดประเภทได้แน่นอน (Braunegg และคณะ, 1998)



รูปที่ 7 วิถีการสังเคราะห์ PHB และ PHBV ใน *Azotobacter salinestris* ปฏิกิริยามีดังนี้: 1, glucose catabolism; 2, α-ketothiolase; 3, acetoacetyl-CoA reductase; 4, PHA synthase; 5, isocitrate lyase; 6, malate synthase; 7, succinate dehydrogenes; 8, methylmalonyl-CoA mutase; 9, propionyl-CoA carboxylase; 10, β-oxidation pathway: enoyl-CoA hydratase และ L-(+)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenes; 11, Na+-dependent succinate export. (ลูกศรหนาหมายถึง วิถี multi-enzyme ลูกศรประหมายถึง กิจกรรมลดลงเนื่องจากภาวะในการเติบโต) (Page และคณะ, 1997)

การผลิตโคพอลิเมอร์ของ PHBV โดยควบคุมสัดส่วนของ 3HV

การควบคุมสัดส่วนของ 3HV ใน PHBV สามารถทำในขั้นตอนการผลิต โดยศึกษาถึงผลการแปรผันชนิดและปริมาณของซับสเตรตหลัก ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน และ เกลือแร่อื่นๆ ตลอดจนการแปรผันระยะเวลาในการเติมซับสเตรต และปัจจัยการเลี้ยงเชื้ออื่นๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถและมีรูปแบบการนำซับสเตรตแต่ละชนิดไปใช้ในการผลิต 3HV ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้การศึกษาวิจัยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV มีรายงานไว้ ดังตัวอย่างต่อไปนี้

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนผสมต่อสัดส่วนของ 3HV

การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมต่อสัดส่วนของ 3HV ใน PHBV โดยการเติมกรดหรือเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับน้ำตาลเมื่อเลี้ยง *Bacillus* โดย Chen และคณะ (1991) พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถสังเคราะห์ PHA คือ *Bacillus megaterium* DSM90 *B. laterosporus* DSM335 *B. subtilis* DSM10 *B. sphaericus* DSM28 *B. cereus* DSM31 *B. amyloliquefaciens* DSM7 *B. licheniformis* DSM394 *B. macerans* DSM2832 *B. circulans* DSM1529 *B. thuringiensis* DSM2046 และ *B. mycoides* DSM2048 ในการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกใช้อาหารสูตรอุดม (rich medium) จากนั้นนำเซลล์มาล้างแล้วย้ายมาลงในอาหารแร่ธาตุที่ไม่มีไนโตรเจน พบว่า ทุกสายพันธุ์สังเคราะห์ได้เฉพาะ PHB แต่เมื่อเติมกรดโพรพิโอนิก วาเลอริก หรือเฮบตาโนเอต 1.5 กรัมต่อลิตร จึงสามารถสังเคราะห์ 3HV ได้ และพบว่า *B. megaterium* สามารถเติบโตได้สูงที่สุด คือได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.2 และ 7.2 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดที่ผลิตโดย *B. circulans* คือ 57.3 และ 56.4 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในโพรพิโอนิกและวาเลอริก ตามลำดับ พบว่า สัดส่วนของ 3HV ที่ได้สูงประมาณ 50 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* โดยใช้กรดโพรพิโอนิก แต่เมื่อใช้กรดวาเลอริกพบว่าได้ 3HV ต่ำกว่าเล็กน้อย ส่วนการใช้กรดเฮบตาโนอิกนั้นเชื้อเติบโตช้ามาก

สำหรับการศึกษาใน *Bacillus thuringiensis* R-510 ที่แยกได้จากดินซึ่งสามารถสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ได้และทนต่อความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่สูง จากผลการศึกษาการใส่โพรพิโอนิกตั้งแต่ 0.1 ถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ช่วงการเติบโตระยะพักตัว (lag phase) นานขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้น โดยได้ปริมาณโคพอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 44.5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในขณะที่ได้ 3HV เท่ากับ 33 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อใส่โพรพิโอนิกเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสูงถึง 80 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อให้โพรพิโอนิกเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Lee K. T. และคณะ, 1995)

จากการศึกษาการสังเคราะห์ PHBV ใน *Alicaligenes eutrophus* พบว่าเมื่อให้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวมีการสังเคราะห์เฉพาะ PHB แต่เมื่อเติมกรดโพรพิโอนิกร่วมด้วย ทำให้สัดส่วนของ 3HV สูงขึ้นตามปริมาณโพรพิโอนิกที่เพิ่มขึ้น เมื่อใช้โพรพิโอนิกอย่างเดียว ปริมาณ 0.2 ถึง 3.0 กรัมต่อลิตรได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 22 ถึง 45 โมลเปอร์เซ็นต์ และเป็นการยากในการผลิต PHBV ให้มีสัดส่วนของ 3HV มากกว่า 50 โมลเปอร์เซ็นต์ (Doi, 1987a) ส่วนการใช้กรดบิวทิริกและวาเลอริกพบการสังเคราะห์ 3HV ได้สูงตั้งแต่ 0 ถึง 95 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามปริมาณกรดที่ให้เพิ่มขึ้น (Doi, 1987b)

การศึกษาใน *Pseudomonas pseudoflava* ที่สามารถสังเคราะห์ PHBV จากกลูโคสและกรดโพรพิโอนิก พบว่า เมื่อเติมโพรพิโอนิก 0.3 กรัมต่อลิตรเชื้อมีการเติบโตและการผลิต PHBV สูงสุดได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณพอลิเมอร์เท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตร (หรือเท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 3.5 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพรพิโอนิกสูงกว่านี้พบว่าการเติบโตของแบคทีเรียถูกยับยั้ง (Bertrand และคณะ, 1990) และจากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp. EL-2 ในอาหารที่เติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และกรดโพรพิโอนิก 4 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ 3HV ในสัดส่วนที่สูงถึง 49.3 โมลเปอร์เซ็นต์ (Son และ Lee, 1996)

เมื่อเลี้ยง *Azotobacter vinelandii* UWD เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ในอาหารที่เติมกลูโคสร่วมกับกรดที่ประกอบด้วยคาร์บอนตั้งแต่ 3 ถึง 9 อะตอม พบว่าเชื้อนี้สามารถใช้กรดวาเลอริกเป็นซับสเตรตในการสังเคราะห์ 3HV แต่ไม่สามารถสังเคราะห์จากโพรพิโอนิก และอัลคาโนเอตอื่นได้ โดยพบว่า ผลิตโคพอลิเมอร์ได้ปริมาณเพียงเล็กน้อย รวมทั้งมีผลการยับยั้งการเติบโตของเชื้อด้วย (Page และคณะ, 1992)

การศึกษาถึงผลของชนิด และปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่อสัดส่วนของ 3HV จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *Alcaligenes latus* *Bacillus cereus* *Pseudomonas pseudoflava* *Pseudomonas cepacia* *Micrococcus halodenitrificans* และ *Alcaligenes eutrophus* ที่ให้กลูโคสและกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเติบโตและการสังเคราะห์พอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ โดยการศึกษานี้สามารถผลิต 3HV ได้สูงถึง 50 โมลเปอร์เซ็นต์จาก *B. cereus* ถึงแม้จะผลิตพอลิเมอร์ได้ในปริมาณน้อย นอกจากนี้เมื่อใช้วาเลอริกแทนโพรพิโอนิกใน *A. latus* พบการผลิต 3HV ที่สูงขึ้น ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สัดส่วนโมโนเมอร์ที่ผลิตขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ โดยอาจมีเอนไซม์สำคัญ (key enzyme) ในการสังเคราะห์ 3HV และ/

หรือการต่อเชื่อมสายของพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน (Ramsay และคณะ, 1990) สำหรับการเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17699 ในอาหารที่มีกรดโพรพิโอนิกร่วมกับฟรักโตส พบว่า ความเข้มข้นของโพรพิโอนิก 0.5 กรัมต่อลิตรให้อัตราการผลิตจำเพาะของ 3HV สูงที่สุด และในการเลี้ยงแบบเฟดแบช (fed-batch) พบว่า มีการสังเคราะห์ 3HV ต่อไปจนมีค่าสูงถึง 50 โมลเปอร์เซ็นต์ (Kim, J. H. และคณะ, 1992)

ในด้านผลของปริมาณและเวลาในการเติมกรดอินทรีย์ เพื่อเพิ่มสัดส่วนของ 3HV นั้น จำเป็นต้องเติมกรดในปริมาณที่สูงเพื่อต้องการผลิต 3HV ให้ได้สัดส่วนที่สูงถึงแม้ว่ากรดนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ตัวอย่างเช่น การศึกษาใน *Klebsiella oxytoca fadR* (pJM9131) สามารถสังเคราะห์ PHBV ในกลูโคสที่เติมโพรพิโอนิก 1 ถึง 10 มิลลิโมลาร์ตั้งแต่เริ่มต้น โดยสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV ได้ตั้งแต่ 11 ถึง 50 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมกรดภายหลังการเลี้ยงเชื้อพบการเติบโตในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเติมกรดตั้งแต่เริ่มต้น (Zhang และคณะ, 1994) *Agrobacterium* sp. SH1 และ GW014 สามารถสังเคราะห์ PHBV จากกลูโคสและกรดโพรพิโอนิกในการเลี้ยงแบบเฟชแบชโดยเติมโพรพิโอนิกให้มีความเข้มข้นคงที่ที่ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้สัดส่วนของ 3HV ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึง 50 โมลเปอร์เซ็นต์ (Lee E. Y. และคณะ, 1995)

ซับสเตรตที่มีการศึกษาเป็นแหล่งคาร์บอนอีกชนิดหนึ่งคือ แอลกอฮอล์ ได้แก่ การผลิต PHBV จากเอทานอลและเพนทานอล จาก *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 12080 (Park และ Damodaran, 1994a; Park และ Damodaran, 1994b) และจาก *Paracoccus denitrificans* ATCC 17741 (Shimizu และคณะ, 1999a) โดยกรณีแรกเป็นการศึกษาแบบเฟดแบช ซึ่งสามารถสังเคราะห์ 3HV ได้สูงถึง 99 โมลเปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนเดี่ยวต่อสัดส่วนของ 3HV

การใช้ซับสเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว (single carbon substrate) นี้ ได้รับความสนใจศึกษาเพื่อหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตโคพอลิเมอร์จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวจำพวกน้ำตาลหรือน้ำมันได้ ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์และมีราคาถูกกว่ากรดอินทรีย์ เนื่องจากค่าใช้จ่ายหลักในกระบวนการหมักขึ้นอยู่กับราคาของแหล่งคาร์บอน (Lee, 1996b; Lee K. T. และคณะ, 1995) เมื่อคิดราคาในการผลิตพอลิเมอร์จากคาร์บอนเดี่ยวที่มีการผลิต 3HV ร่วมด้วยได้ จะเป็นการลดค่าใช้จ่ายรวมทั้งสามารถควบคุมกระบวนการหมักได้ง่ายขึ้น ซึ่งมีแนวโน้มที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้มากขึ้น (Son และ Lee, 1996) ดังตัวอย่างเช่น การผลิตโคพอลิเมอร์จาก

Alcaligenes sp. AK201 สายพันธุ์ใหม่โดยการใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวต่าง ๆ เช่น เกลืออัลคาโนเอตที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 22 อะตอม และน้ำมัน พบการสังเคราะห์ 3HV ใน PHBV เฉพาะในแหล่งคาร์บอนที่มีคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคี่ตั้งแต่ 3 ถึง 19 อะตอม (Akiyama และคณะ, 1992) *Agrobacterium* sp. SH-1 และ GW-014 ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่า มีการสังเคราะห์ 3HV ในช่วง 1.3 ถึง 11.4 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยได้ 3HV สูงเมื่อเลี้ยงในน้ำตาลเพนโตส เช่น อะราบิโนสหรือไซโลส และสังเคราะห์ PHBV จากซูโครสได้ดีที่สุดแต่ได้ 3HV ต่ำเพียง 3.3 โมลเปอร์เซ็นต์ (Lee E. Y. และคณะ, 1995) ใน *Alcaligenes eutropus* H16 สายพันธุ์กลาย R3 ที่ให้ฟรักโตส กลูโคนิก ซัคซินิก อะซิเตต หรือ แลคเตต เป็นสารอาหารคาร์บอนเพียงชนิดเดียว พบว่าการใช้ฟรักโตสจะให้ 3HV สูงที่สุด คือ 7 โมลเปอร์เซ็นต์ (Steinbuchel และ Pieper, 1992) การศึกษาการใช้กลูโคส ฟรักโตส กลีเซอรอล ซอร์บิทอล 1 เปอร์เซ็นต์ หรือกรด กลูโคนิก โพรพิโอนิก วาเลอริก 0.5 เปอร์เซ็นต์อย่างใดอย่างหนึ่ง เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวเพื่อผลิต PHBV จาก *Pseudomonas* sp. EL-2 ซึ่งพบว่าเชื้อสามารถเจริญในกลูโคสได้ดีโดยมี 3HV เท่ากับ 6.9 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใช้โพรพิโอนิก 0.4 เปอร์เซ็นต์พบการสะสม 3HV เพิ่มขึ้นถึง 49.3 โมลเปอร์เซ็นต์ (Son และ Lee, 1996) การศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 พบว่า การใช้กรดวาเลอริกและโพรพิโอนิกเป็นคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 95 และ 37 โมลเปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น เมื่อใช้โซเดียม-4-ไฮดรอกซีวาเลอเรตเชื้อสามารถสร้างโมโนเมอร์ของ 4HB ได้ (อัญชนา ศุรติขจร, 2537) และมีการศึกษาแบคทีเรียอื่น ๆ เช่น *Rhodococcus* sp. *Corynebacterium* sp. และ *Norcardia* sp. ซึ่งสามารถผลิต PHBV จากกลูโคสเพียงชนิดเดียวได้ (Anderson และ Dawes, 1990)

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อสัดส่วนของ 3HV

การใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ เช่น การเลี้ยง *Alcaligenes* sp. SH-69 ที่ใช้กลูโคส ซูโครส ซอร์บิทอล แมนนิทอล หรือโซเดียมกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดยีสต์ หรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณโคพอลิเมอร์และสัดส่วนของ 3HV ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่าปริมาณโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น แต่สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ลดลง ส่วนการใช้ยูเรียและกลูโคส ซอร์บิทอล หรือโซเดียมกลูโคเนตทำให้สัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้น (Kim, G. J. และคณะ, 1992) สำหรับ *Alcaligenes* sp. SH-69 ที่ใช้กลูโคสเพียงชนิดเดียวและใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ผลิต 3HV ได้เท่ากับ

2.0 ถึง 21.7 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เป็นโมลต่อโมลที่สูงขึ้นทำให้ปริมาณ PHBV สูงขึ้น แต่สัดส่วนของ 3HV และน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำลง (Rhee และคณะ, 1993) ใน *Alcaligenes eutrophus* ที่ควบคุมการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปตลอดการเลี้ยงจะได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV สูงขึ้นประมาณสองเท่า (Aragao และคณะ, 1996)

การศึกษาผลของซับสเตรตและปัจจัยอื่นต่อสัดส่วนของ 3HV

นอกเหนือจากซับสเตรตหลัก คือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้ว ยังมีรายงานถึงสารอาหารอื่นๆ ที่มีผลต่อสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ดังตัวอย่างการวิจัย ผลของกรดอะมิโนต่อการผลิต PHBV จาก *Alcaligenes* sp. SH-69 ในอาหารที่มีกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว และมีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ คือ ไกลซีน กลูตาเมต อะลานีน ทรีโอนีน เมทไธโอนีน เซอรีน ไอโซลิวซีน ไลซีน ลิวซีน และวาลีน พบว่า การเติมทรีโอนีน ไอโซลิวซีน และวาลีนทำให้สัดส่วนของ 3HV สูงขึ้นอย่างชัดเจน (Yoon และคณะ, 1995) การศึกษาถึงผลของโอลิเอตและ/หรืออะซิเตตในการเลี้ยง recombinant *Escherichia coli* ที่ใช้กลูโคส และกรดโพรพิโอนิกหรือวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อเติมโอลิเอตทำให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้น 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้เติมโอลิเอต (Yim และคณะ, 1996) ในการศึกษาผลการกระตุ้นการสังเคราะห์ PHB ของกรดอะมิโน กรดไขมัน และกรดอินทรีย์บางชนิดจาก *Alcaligenes* sp. A-04 โดยเติมกรดกลูตามิก กลูตามีน แอสปาติก แอสปาราจีน โปรลีน ไลซีน ทรีโอนีน ซีสเตอีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จินีน และเมทไธโอนีน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ลิวซีน ไอโซลิวซีน อาร์จินีน และเมทไธโอนีน กระตุ้นการสังเคราะห์ PHB และมีผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้น (ศิรวิทย์ สิตปรีชา, 2541) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงผลของ pH ต่อการสร้าง 3HV ที่ได้สัดส่วนของ 3HV สูงขึ้นตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้น (Chung และคณะ, 1997) และผลของความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนที่ต่ำทำให้การผลิต PHBV สูงขึ้น (Lefebvre และคณะ, 1997; Park และคณะ, 1997)

แนวทางการนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

ตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1976 บริษัท Zeneca Bioproducts ในเครือบริษัท ICI เริ่มค้นคว้าการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม จากนั้นต้นทศวรรษที่ 80 จึงเริ่มมีการจดสิทธิบัตรการผลิตตลอดกระบวนการผลิตตั้งแต่การสกัดและการผสมกับพอลิเมอร์อินทรีย์ชนิดอื่นๆ จากเชื้อ *Ralstonia eutropha* ซึ่งผลิตภายใต้ชื่อ Biopol และต่อมาได้ขายโอนกิจการให้แก่บริษัท Monsanto ประเทศสหรัฐอเมริกา ต่อมาในปี ค.ศ. 1990 บริษัท Wella ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทดูแลเส้นผมของเยอรมนีได้นำมาทำขวดแชมพู และในปี ค.ศ. 1991 และ 1992 มีการนำขวดชนิดนี้มาใช้ประโยชน์และมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกาตามลำดับ จนถึงปี 1999 มีกำลังการผลิต 100,000 ตัน ราคากิโลกรัมละ 3.31 เหรียญสหรัฐ (Lee, 1999) นอกจากนั้นยังมีการผลิตในอีกหลายประเทศ เช่น บริษัท Chemie Linz ประเทศออสเตรียได้ผลิต PHB ในเชิงการค้าจาก *Alcaligenes latus* บริษัท Bio Ventures Alberta Inc. ประเทศแคนาดาได้ผลิตจาก recombinant *E. coli* บริษัท Polyfirm Inc.ประเทศแคนาดาได้ผลิตจากไซโลสโดยใช้ *Pseudomonas cepacia* บริษัท Berlin Packing Corp. ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตขวดแชมพู บริษัท Bioscience Ltd. ประเทศฟินด์แลนด์ได้นำมาใช้ทางด้านการแพทย์ (Lee, 1996a) บริษัท Kohap Co. ประเทศเกาหลีก็มีการผลิตเป็นเชิงพาณิชย์ (Chang และคณะ, 1994) ซึ่งการประยุกต์ใช้งานนั้นแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

การประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม (Kimura, 1993; Lee, 1996a)

1) ใช้เป็นวัสดุทางด้านศัลยกรรม เช่น หลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็ม ไหมเย็บแผล

2) ใช้ทำแคปซูลบรรจุยา เพื่อให้แคบซูลถูกย่อยสลายและค่อย ๆ ปล่อยยาออกมาในปริมาณน้อย ๆ เป็นระยะเวลานาน

การประยุกต์ใช้ทางด้านเกษตรกรรม

1) ใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มยาฆ่าแมลง ยาปราบวัชพืช หรือปุ๋ย ในหลักการเดียวกับแคปซูลบรรจุยา (Lee, 1996a)

2) ใช้ทำแหจับปลาสำหรับใช้ในน้ำทะเลได้เป็นเวลานาน และสามารถกำจัดเมื่อเลิกใช้โดยทิ้งลงใต้ทะเลได้ (ค่าความถ่วงจำเพาะ 1.25) เนื่องจากสามารถย่อยสลายอย่างรวดเร็ว (Brandl และคณะ, 1995)

การประยุกต์ใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์ หรืออุปกรณ์ใช้สอยอื่น

1) ใช้ผลิตขวดแชมพู ที่ประกอบด้วยส่วนฝาที่ต้องการความแข็งแรงและปิดได้ดี จึงใช้ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV ต่ำ ส่วนตัวขวดต้องการ 3HV ในสัดส่วนที่สูงกว่า (เท่ากับ 10 ถึง 20 โมลเปอร์เซ็นต์) เพื่อให้มีความยืดหยุ่นและความเหนียว รวมทั้งไม่มีปฏิกิริยากับแชมพูซึ่งจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ (Cox, 1994)

2) ใช้ทำบรรจุภัณฑ์บรรจุอาหารประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป แผ่นฟิล์ม ถนอมอาหาร (Doi, 1990; Lee, 1996a)

3) ใช้ทำหมวกนิรภัยสำหรับจักรยาน ซึ่งได้จากการถักเส้นใยของ PHBV ที่มี 3HV เท่ากับ 9 โมลเปอร์เซ็นต์ เพื่อให้มีความแข็งแรง (Brandl และคณะ, 1995)

4) ใช้ทำแผ่นกรองอากาศทำจากแกรนูลของส่วนผสมโซเดียมคลอไรด์ 90 เปอร์เซ็นต์ และ PHBV 10 เปอร์เซ็นต์ (ซึ่งมีส่วนผสมของ 3HV 9 โมลเปอร์เซ็นต์) (Brandl และคณะ, 1995)

5) ใช้ทำวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ด้ามมีดโกน เป็นต้น (Cox, 1994; Lee, 1996a)

6) ใช้ทำวัสดุอื่น ๆ เช่น ที่วางลูกกอล์ฟ วัสดุเส้นใย (nonwoven fabrics) กาวที่ละลายด้วยความร้อน สารเคลือบผิว แผ่นฟิล์ม ในบางประเทศนำมาใช้ทำบัตรเครดิต เป็นต้น (Cox, 1994; Lee, 1996a; Madison และ Huisman, 1999)

การประยุกต์ใช้ PHA ในปัจจุบันมักคำนึงถึงลักษณะกลไกและการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ เพื่อไม่ให้มีผลต่อสิ่งแวดล้อมภายหลังการใช้งาน (life-spans) แล้ว สำหรับการศึกษาในอนาคตได้มีเป้าหมายสำคัญ คือ การประเมินผลกระทบด้านพิษวิทยาต่อระบบนิเวศน์จากการย่อยสลายของวัสดุทางชีวภาพนี้ รวมทั้งการวิเคราะห์วัฏจักรชีวิต (life-cycle) เพื่อจัดการการใช้วัสดุดังกล่าวให้เหมาะสม (Brandl และคณะ, 1995)

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งแยกได้ใหม่ และพบว่าผลิต PHB ได้ดีจากน้ำตาลทรายและกากน้ำตาล โดยได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (รัตนศิริ มุทิตากุล, 2538) และสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้จากกรดอินทรีย์และน้ำตาลบางชนิด โดยใช้น้ำตาลซูโครสกับกรดโพรพิโอนิกหรือกรดวาเลอริกเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน (พิสิษฐ คงกำเนิด, 2540) โดยผลการวิจัยพบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHBV ได้เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นซับสเตรตสำหรับ 3HB และใช้กรดโพรพิโอนิกหรือกรดวาเลอริกเป็นซับสเตรตสำหรับ 3HV โดยได้โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV สูง แต่ปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ได้ต่ำ ส่วนเมื่อเลี้ยงเชื้อในแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครสกับกรดโพรพิโอนิกได้โคพอลิเมอร์ปริมาณสูงขึ้น แต่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในซูโครสผสมกับกรดวาเลอริก จากที่กล่าวมาข้างต้นแล้วว่า โคพอลิเมอร์ PHBV มีสมบัติด้านต่างๆ ดีกว่าโฮโมพอลิเมอร์ PHB จึงมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ แต่สมบัติของ PHBV ที่ผลิตได้จะมีความแตกต่างกัน เนื่องจากสัดส่วนของ 3HV ที่ประกอบในโคพอลิเมอร์ จากผลการวิจัยของคณะผู้วิจัยกลุ่มนี้โดย อัญชนา ศุรติขจร (2537) ได้รายงานการผลิต โคพอลิเมอร์ PHBV จากเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 จากกรดอินทรีย์และน้ำตาลบางชนิด เช่น กรดวาเลอริกผสมกับกรดบิวทิริก และกรดวาเลอริกผสมกับฟรักโตสในอัตราส่วนต่างๆกัน มีผลให้ได้ PHBV ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่างกัน และเมื่อนำตัวอย่างโคพอลิเมอร์บางชนิดที่ผลิตได้ไปทดสอบสมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลเปรียบเทียบกับ PHB พบว่า โคพอลิเมอร์มีลักษณะของแผ่นฟิล์มและสมบัติด้านต่างๆ ที่ดีกว่า PHB มีรายงานว่าโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ในช่วงไม่เกิน 30 โมลเปอร์เซ็นต์ เป็นโคพอลิเมอร์ที่มีสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ (Nobes และคณะ, 1994 และ Johansson, 1992)

ดังนั้นการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จากเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่ โดยมุ่งศึกษาผลของซับสเตรตและปัจจัยบางประการที่มีความสำคัญต่อการสร้าง PHBV เพื่อให้ได้สัดส่วน (mole fraction) ของโมโนเมอร์ 3HV ที่เหมาะสม ซึ่งจะมีผลให้สามารถผลิตได้โคพอลิเมอร์ที่มีสมบัติทางเคมี กายภาพ และเชิงกลเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้งานต่อไป

วัตถุประสงค์

ศึกษาผลของซับสเตรตต่างๆ รวมทั้งภาวะในการเลี้ยงเชื้อบางประการ ที่มีต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) ในองค์ประกอบของโคพอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) (PHBV) และปริมาณโคพอลิเมอร์ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อให้สามารถเลือกภาวะในการเลี้ยงเชื้อให้ได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่มีสมบัติตามวัตถุประสงค์ เพื่อความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้

ขั้นตอนการวิจัย

1. ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019
2. ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019
3. ศึกษาภาวะบางประการในการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019
4. ศึกษาผลของซับสเตรตที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019
5. ศึกษาผลของการเติมซับพลีเมนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019