บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาสำคัญของโลกและทวีความรุนแรงขึ้นทุกขณะ ในบรรดาปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้น ขยะเป็นปัญหาใหญ่ที่ยากต่อการหาวิธีกำจัดที่เหมาะสมโดยวิธีใดเพียงวิธีเดียว ส่วนหนึ่งของปัญหาขยะที่ยากต่อการกำจัด คือ ขยะที่เกิดจากพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติหรือย่อยสลายได้ยาก การสะสมขยะพลาสติกในสิ่งแวดล้อมมีปริมาณมากถึง 25 ล้านตันต่อปี(Lee, 1996a) พลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิเอทธิลีน (polyetylene) หรือ PE พอลิโพรพิลีน (polypropylene) หรือ PP พอลิสไตรีน(polystyrene) หรือ PS และพอลิไวนิลคลอไรด์(polyvinyl chloride) หรือ PVC เป็นต้น (Evan และSikdar, 1990) การที่พลาสติกสังเคราะห์ดังกล่าวนี้ได้รับความนิยมในการใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความคงทนแข็งแรง ไม่เป็นสนิม มีสีสันสวยงาม น้ำหนักเบา และทำให้เป็นรูปร่างต่างๆได้ง่าย คาดว่าในปี ค.ศ.2000 ปริมาณการใช้พลาสติกเหล่านี้จะมีปริมาณสูงถึง 150 ล้านตัน (Braunegg และคณะ, 1998) ด้วยเหตุนี้เองความพยายามที่จะลดอันตรายและปัญหาที่เกิดจากขยะพลาสติกในหลายประเทศจึงได้ใช้โปรแกรมการจัดการของเสียที่เป็นของแข็ง โดยทั่วไปการกำจัดขยะในโปรแกรมนี้มี 3 แนวทางคือ การถมที่ การเผาไหม้ และการนำกลับมาใช้ใหม่ การถมที่มีข้อเสียคือ พื้นที่รองรับขยะมีจำกัด และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากพลาสติกใช้เวลาสลายตัวในดินนานทำให้เป็นอุปสรรคต่อการไหลซึมของน้ำ การเผาไหม้เป็นวิธีที่ต้องใช้ต้นทุนสูง และอาจมีปัญหาการควบคุมควันหรือเขม่า รวมทั้งก๊าซพิษที่อาจเกิดขึ้น เช่น ไฮโดรเจนไซยาไนด์ ไฮโดรเจนคลอไรด์ และคาร์บอนมอนอกไซด์ นอกจากนี้ยังรวมถึงการลดปริมาณขยะพลาสติกโดยการพัฒนาพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable plastics) โดยที่พลาสติกดังกล่าวนี้ต้องรักษาสมบัติของพลาสติกสังเคราะห์แบบดั้งเดิมไว้ทั้งทางกายภาพและทางเคมี และควรที่จะย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์(Evan และSikdar, 1990 ; Lee, 1996a ; Lee, 1996b ; Braunegg และคณะ, 1998)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต(polyhydroxyalkanoate) หรือ PHA

PHAเป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งสามารถสังเคราะห์และสะสมได้โดยจุลินทรีย์บางชนิด PHAถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ในภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารจำเป็นบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือออกซิเจน และมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ(SteinbuchelและFuchtenbusch, 1998) โดย PHA ที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกเก็บไว้ในรูปแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ จำนวนและขนาดของแกรนูลในแต่ละเซลล์ จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Alcaligenes eutrophus* จะมีแกรนูล 8-13 แกรนูลต่อเซลล์ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแกรนูลเท่ากับ 0.2-0.5 ไมครอน (Doi, 1990) จุลินทรีย์เก็บ PHA ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งของรีดิวซิ่งเพาเวอร์ PHAประกอบด้วย monomer units หลายชนิดโดยพบมากกว่า 90 ชนิด ซึ่งทั้งหมดอยู่ในรูป D-(-) configuration เนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA PHA มีสมบัติทางเคมีและกายภาพที่คล้ายกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีบางชนิด เช่น PE และ PP เมื่อPHAถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ ทั้ง แบคทีเรีย สาหร่าย และเชื้อรา ซึ่งมีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน ทะเล และในน้ำทิ้ง ได้ผลเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (และมีเทนภายใต้ภาวะไร้อากาศ) ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังสามารถนำPHAมาใช้ใหม่ได้เช่นเดียวกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ใช้ในปัจจุบัน ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการนำ PHA มาประยุกต์ใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์ดังกล่าว (AndersonและDawes, 1990 ; Lee, 1996a,b ; MadisonและHuisman, 1999)

การค้นพบ PHA

ในปี ค.ศ.1888 Beijerinck สังเกตพบแกรนูลเป็น refractile bodies ภายในเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นในปี 1926 Lemoigne ตรวจพบพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ PHB ซึ่งเป็น PHA ชนิดหนึ่ง เป็นครั้งแรกจาก *Bacillus megaterium* (Brauneggและคณะ, 1998) WallenและRodwedder(1974)รายงานการค้นพบ PHA ชนิดอื่นนอกจาก PHB โดยพบเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ที่สกัดได้ในส่วนคลอโรฟอร์มของ activated sewage sludge โดยพบว่า PHA ประกอบด้วย 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตเป็นองค์ประกอบหลัก และมีกรด 3-ไฮดรอกซีที่มีคาร์บอนจำนวน 6-7 อะตอมเป็นองค์ประกอบรอง โดยเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ที่ได้นี้มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า PHB และไม่ละลายใน

เอทานอลร้อนเหมือนโฮโมพอลิเมอร์ Findleyและ White (1983) ตรวจสอบพอลิเมอร์ที่สกัดจากตะกอนทะเลโดยใช้การวิเคราะห์ด้วย capillary gas-chromatography(GC) พบ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต ส่วนพอลิเมอร์ที่สกัดได้จาก *B. megaterium* พบ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ประมาณ 95 % 3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอตประมาณ 3% 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต 2 % และกรด3-ไฮดรอกซีอื่นๆอีกเล็กน้อย Odhamและคณะ(1986)พบว่า PHAใน sewage sludge มีคาร์บอน 4 , 6 และ8 อะตอมเป็นองค์ประกอบ ต่อมาในปี 1988 Lageveen รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas oleovorans* ใน n-octane พอลิเมอร์ที่ได้มี 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต และ3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอตเป็นองค์ประกอบหลักและองค์ประกอบรองตามลำดับ (Anderson และDawes, 1990)

จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์และสะสมPHA

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAได้ ดังแสดงในตารางที่1

ตารางที่1.จุลินทรีย์ที่สะสมPHA (Brandl และคณะ, 1990 ; Lee, 1996a ; Madisonและ Huisman,1999)

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

วิธีการผลิต PHB จากจุลินทรีย์ (Lee, 1996b)

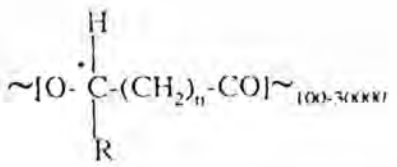
การผลิต PHB จากจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

1. growth-associated production เป็นการผลิต PHB โดยไม่ต้องมีการจำกัดปริมาณสารอาหารที่จำเป็น จุลินทรีย์สามารถสะสมพอลิเมอร์ได้ในระหว่างการเติบโต จุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น *Alcaligenes latus* สายพันธุ์กลายของ *Azotobacter vinelandii* และ recombinant *Escherichia coli* เป็นต้น

2. non-growth-associated production เป็นการผลิต PHB ที่จำเป็นต้องจำกัดปริมาณสารอาหารจำเป็น เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โปแตสเซียม ออกซิเจน หรือ ซัลเฟอร์ เมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์และสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้น จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น *Alcaligenes eutrophus* , *Protomonas extorquens* และ *Pseudomonas oleovorans* เป็นต้น

โครงสร้างของPHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (aliphatic polyesters)ที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ออกซิเจนและไฮโดรเจน สูตรโครงสร้างทั่วไปแสดงดังรูปที่1 โมโนเมอร์ของสายพอลิเมอร์ต่อกันแบบหัวต่อหาง โดยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวแรกกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวถัดไปตรงตำแหน่งบีต้าคาร์บอน ซึ่งจะเป็นไครัลคาร์บอน(chiral carbon) ที่แสดงโครงสร้างเป็น *R*-configuration หมู่อัลคิล(R)อาจจะเป็นแบบพันธะไม่อิ่มตัว(unsaturated) แบบอะโรมาติก แบบฮาโลจิเนต หรือแบบแตกกิ่งก้านก็ได้ (Madison และHuisman,1999)



เมื่อ n = 1 R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต) ; P(3HP)
R = เมทธิล (CH_3) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ; P(3HB)
R = เอทธิล (C_2H_5) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ; P(3HV)
R = โพรพิล (C_3H_7) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) ; P(3HC)
R = บิวทิล (C_4H_9) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต) ; P(3HH)
R = เพนทิล (C_5H_{11}) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต); P(3HO)
R = เฮกซิล (C_6H_{13}) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต) ; P(3HN)
R = เฮปทิล (C_7H_{15}) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีเดกคาโนเอต) ; P(3HD)
R = ออกทิล (C_8H_{17}) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีอันเดกคาโนเอต); P(3HUD)
R = โนนิล (C_9H_{19}) สารนี้คือ พอลี(3-ไฮดรอกซีโดเดกคาโนเอต); P(3HDD)
เมื่อ n = 2 R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลี(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ; P(4HB)
เมื่อ n = 3 R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลี(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ; P(5HV)

C* คือ เบต้าคาร์บอน

รูปที่1.สูตรโครงสร้างของ PHA (Lee, 1996a,b ; Brauneggและคณะ, 1998)

การจัดจำแนกชนิดของ PHA

1. การจัดจำแนกชนิดตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยโมโนเมอร์ (Lee, 1996a ; Yimและคณะ, 1996 ; HazenbergและWithlot, 1997)

1.1 short-chain-length (SCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม

1.2 medium-chain-length(MCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม

1.3 long-chain-length(LCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

2. การจัดจำแนกชนิดโดยแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ PHA แบ่งออกเป็น 2 ประเภทดังนี้

2.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต(poly3-hydroxybutyrate)และพอลิ3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly3-hydroxyvalerate) เป็นต้น

2.2 เฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้

-โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate หรือ PHBV) พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-co- 4-hydroxybutyrate หรือ P(3HB-co-4-HB)] 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)] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxyvalerate);P(3HB-co-3HV-co-4HV)] เป็นต้น

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือ PHB

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด สูตรเคมีของ PHB คือ $[C_4H_6O_2]_n$ PHB ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นถูกเก็บไว้ในแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ แกรนูลPHBถูกหุ้มด้วยเมมเบรนที่มีไขมันและโปรตีนหนาประมาณ 2 นาโนเมตร แต่ละแกรนูลมีสายโซ่พอลิเมอร์อย่างน้อย 1,000 โมเลกุล PHBที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรียมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากประมาณ 10^5-10^6

และมีระดับความเป็นผลึกสูง(degree of crystallinity)มากกว่า 50 % มีอุณหภูมิหลอมละลายประมาณ 180 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากพอลิเมอร์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น โปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ (Byrom, 1987 ; Doi, 1990) แบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถสะสม PHB ได้ 30-80 % ของความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเติบโตภายใต้ภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ และมีการจำกัดปริมาณสารอาหารจำเป็น(Lee,1996a;MadisonและHuisman,1999)

สาเหตุที่ PHB ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ เนื่องจากมีสมบัติทางเคมีและกายภาพคล้ายกับ PP และPE สามารถย่อยสลายได้โดยสมบูรณ์โดยวิธีทางชีวภาพ มีสมบัติเป็นพิโซอิเลคตริก (piezoelectric)ที่เข้ากับเนื้อเยื่อคนได้ มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก(thermoplastic) และสามารถนำไปผสม (blending) กับพอลิเมอร์อื่นๆเพื่อให้มีสมบัติตามต้องการ ดังนั้นจึงสามารถนำPHBไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆทั้งทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมเภสัชกรรม (Brauneggและคณะ1998 ; SteinbuchelและFuchtenbusch,1998)

หน้าที่ของPHB

1. เป็นแหล่งพลังงาน และ/หรือ แหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์ใช้ PHB เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานในภาวะขาดแคลนสารอาหารเพื่อการอยู่รอด MacraeและWilkinson(1958) (Brauneggและคณะ, 1998)รายงานว่า *Bacillus megaterium* ที่มีปริมาณ PHB สูงช่วยชะลอการย่อยสลายตัวเองและการตายเนื่องจากการขาดไนโตรเจน Sierra และGibbons(1962) (Braunegg และคณะ, 1998)ทำการศึกษาบทบาทของ PHB ต่อการหายใจและการอยู่รอดของ *Micrococcus halodenitrificans* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการอยู่รอดและปริมาณ PHB StokesและParson(1968)(DawesและSenior, 1973)พบว่า *Sphaerotilus discophorus* ที่มีปริมาณ PHB มากอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่มี PHB หรือมีปริมาณต่ำ เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Tal และ Okon (1985) (Doi, 1990) พบว่าเซลล์ *Azospirillum brasilense* ที่มีปริมาณ PHB สูง มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่มี PHB ปริมาณต่ำ

2. การงอกของสปอร์(sporulation)และการสร้างซีสต์(encystment)

PHB เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการงอกของสปอร์และการสร้างซีสต์ Juni และ Heym(1956) พบว่า *Bacillus cereus* สายพันธุ์ T นำPHBไปใช้ในการสร้างสปอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าพีเอชสูง KominekและHalvorson(1965)รายงานว่า

B. cereus สร้างและสะสมPHBโดยใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณPHBสูงสุดในช่วงที่เชื้อมีการเติบโตแบบทวีคูณ หลังจากนั้นปริมาณ PHB จะลดลง เนื่องจากการสร้างสปอร์ Nakata(1963) พบว่า *B. cereus* ใช้อะซีเตตและ PHB เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการสร้างสปอร์เช่นกัน StevensonและSocolofsky(1966)พบว่าการสะสมPHBโดย *Azotobacter vinelandii* เกิดขึ้นในระยะการเติบโตที่ไม่สมดุล เซลล์จะใช้แหล่งคาร์บอนภายนอกได้เร็วกว่าการตรึงไนโตรเจนที่จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนไปเป็นองค์ประกอบของเซลล์ ดังนั้นการสะสม PHB ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ จะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการสร้างซีสต์

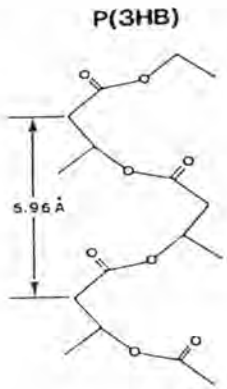
3. เป็นแหล่งอิเลคตรอน(electron sink)

JacksonและDawes(1976)รายงานว่า *Azotobacter beijerinckii* มี NADH oxidase activity ต่ำลงเมื่อจำกัดปริมาณออกซิเจน แต่อัตราส่วน NADH/NAD ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นทันทีเมื่อออกซิเจนหมดไป ซึ่งทำให้เกิดการสร้าง PHB ขึ้น เพื่อใช้เป็นแหล่งเก็บอิเล็กตรอน จากนั้น NADH oxidase activity เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้งเมื่อภาวะการขาดออกซิเจนเริ่มดีขึ้น นำมาซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่าออกซิเจนละลายพร้อมกับการลดลงของปริมาณ PHB เนื่องจากมีการใช้ PHB เพื่อสร้างอิเล็กตรอน ทำให้สรุปได้ว่าการสะสม PHBในแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเป็นแหล่งให้อิเลคตรอนได้

โครงสร้างและสมบัติของPHB

1. โครงสร้างผลึก(crystal structure)

CornibertและMarchessault(1972)(อ้างถึงในDawesและSenior,1973;อ้างถึงในDoi,1990)ศึกษาโครงสร้างผลึกของ PHB โดยใช้เทคนิค X-ray diffraction พบว่ารูปร่าง(conformation)ของโมเลกุล PHB เป็นแบบอัดตัวแน่น และเกลียวหมุนขวา (right-handed 2_1 helix) และมีหน่วยซ้ำ fiber repeat 0.596 นาโนเมตรดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่2. โครงสร้างผลึกของ PHB (Doi, 1990)

2.สมบัติทางกายภาพและความร้อน (physical และ thermal properties)

PHB มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก อุณหภูมิหลอมเหลว(melting temperature) ประมาณ 180 องศาเซลเซียส เมื่อผลึกเย็นลงอย่างช้าๆหลังการหลอมเหลวได้เป็นสเฟียรูไลต์(spherulites)ขนาดใหญ่ PHBมีสถานะของแข็งคล้ายแก้ว(glassy state) ที่อุณหภูมิกราสทรานสิชัน(glass-transition) ประมาณ 4 องศาเซลเซียส เมื่อตกตะกอน PHB ด้วยสารละลายเจือจางจะได้ผลึกเป็นชั้นบางๆ ซึ่งความหนาของชั้นผลึกขึ้นกับอุณหภูมิการเกิดผลึก และน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ค่า Young's modulus และ tensile strength ของแผ่นฟิล์ม PHB ใกล้เคียงกับ PP สมบัติบางประการของ PHB เปรียบเทียบกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แสดงดังตารางที่ 2 (Doi,1990)

ตารางที่2. สมบัติบางประการทางกายภาพและความร้อนของพอลิเมอร์ (Doi, 1990)

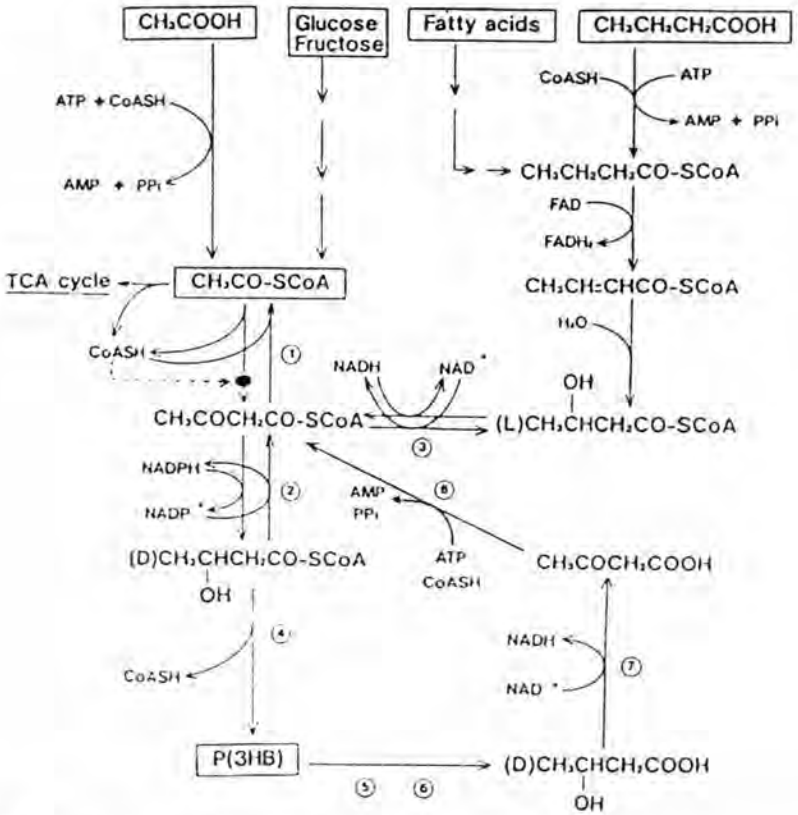
Properties	P (3HB)	Poly-propylene	Poly (Ethylene Terephthalate)	Nylon-6,6
Melting temperature (°C)	180	176	267	265
Glass-transition temperature (°C)	4	−10	69	50
Crystallinity (%)	60–80	50–70	30–50	40–60
Density (g/cm^3)	1.250	0.905	1.385	1.14
Water uptake (wt%)	0.2	0.0	0.4	4.5
Young's modulus (GPa)	3.5	1.7	2.9	2.8
Tensile strength (MPa)	40	38	70	83
Extension needed to break (%)	6	400	100	60

น้ำหนักโมเลกุลเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ โดยจะส่งผลต่ออุณหภูมิกราสทรานสิชัน ความสามารถในการละลาย และความหนืด เป็นต้น PHB ที่ผลิตได้จะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ และภาวะในการเลี้ยงเชื้อ (Doi,1990) YeomและYoo(1995)รายงานการศึกษาผลของ pH ต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHBซึ่งผลิตได้จาก *Alcaligenes* sp.K-912 ได้ว่าเมื่อใช้ค่า pH ในการเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นจะได้ PHB ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยที่ pH เท่ากับ 6.0 6.5 7.0และ8.0 PHB มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 150,000 250,000 580,000 และ650,000 ตามลำดับ

วิถีการสังเคราะห์ PHB

การสังเคราะห์และการควบคุมการสังเคราะห์ PHB ได้ถูกศึกษาอย่างกว้างขวางในเชื้อ *A. eutrophus* *Zoogloea ramigera* และ *Azotobacter beijerinckii* กลไกการสังเคราะห์PHBภายในเซลล์เกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเมตาบอลิซึม ซึ่งPHBจะถูกสังเคราะห์จากสารตั้งต้นคืออะเซติลโคเอ

(acetyl-coA) โดยปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์ 3 ตัว 3-ketothiolaseจะเร่งการรวมตัวของอะเซติลโค-เอ 2 ตัว ให้เป็นอะเซโตอะเซติลโค-เอ (acetoacetyl CoA) จากนั้นสารดังกล่าวนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นดี-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (D-(-)-3-hydroxybutyryl CoA) โดยการเร่งปฏิกิริยาของ NADPH/NADH-linked acetoacetyl-CoA reductase และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรซ์เซชัน (polymerization)ไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthase ดังแสดงในรูปที่3 (Andersonและ Dawes,1990;Doi,1990;Braunegg,1998)



รูปที่3.วิถีการสังเคราะห์ PHB 1,3-ketothiolase ; 2, NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductase ; 3, NADH-linked acetoacetyl-CoA reductase ; 4, PHB synthase ; 5, PHB depolymerase ; 6, D(-)-3-hydroxybutyrate –dimer hydrolase ; 7 , D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase ; 8, acetoacetyl CoA synthetase (Doi,1990)

ในระหว่างการเติบโตตามปกติของจุลินทรีย์ เกิดการคาตาบอไลซ์สารคาร์โบไฮเดรตผ่านวิถี Entner-Doudoroff ไปเป็นไพรูเวต ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนเป็นอะเซติลโค-เอโดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (dehydrogenetion) จากนั้นอะเซติลโค-เอจะเข้าสู่ tricarboxylic cycle(TCA)ด้วยการปล่อย CoASH และถูกออกซิไดซ์ให้คาร์บอนไดออกไซด์และพลังงานในรูป ATP และ reducing equivalents

(NADH,NADPHและ FADH2) จุลินทรีย์จะนำพลังงานและสารตั้งต้น(biosynthetic precursors)ที่ได้ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป อัตราที่อะเซติลโค-เอเข้าสู่TCA cycle ขึ้นกับแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแร่ธาตุอื่นๆ ดังนั้นอัตราการสังเคราะห์PHBจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีอะเซติลโค-เอปริมาณมาก ซึ่งจะเกิดขึ้นในภาวะที่เซลล์ขาดแคลนธาตุอาหารจำเป็น พบว่าเชื้อ *A. eutrophus* ที่ขาดแคลนสารอาหารดังนี้ คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน แมกนีเซียม หรือ ซัลเฟต กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจะสิ้นสุดลง เป็นผลให้ NADH และ NADPHมีปริมาณสูงขึ้น ซึ่งจะไปยับยั้ง citrate synthase และ isocitrate dehydrogenase เป็นผลให้เกิด TCA cycle ช้าลง และอะเซติลโค-เอจะเข้าสู่การสังเคราะห์ PHB ได้เพิ่มมากขึ้น(Doi,1990;Brauneggและคณะ,1998)

การผลิตPHBจาก *Bacillus* sp.

หลังจากการค้นพบPHBจาก *Bacillus megaterium* โดย Lemoigne ในปี 1926 เป็นต้นมา มีการวิจัยการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์ชนิดนี้อีกจำนวนมาก แต่ไม่มากเท่าการศึกษาใน *Alcaligenes eutrophus* ปี 1958 WilliamsonและWilkinson ทำการแยกและประมาณค่า PHB inclusions ของ *Bacilllus* สปีชีส์ต่างๆ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายอัลคาไลน์โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการย่อยสลายและปล่อย intracellular lipid inclusion ออกมา เมื่อวิเคราะห์ inclusion ของ *B. cereus* ที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าประกอบด้วย PHB 89 % และไลพิดที่ละลายได้ในอีเทอร์ 11 % KominekและHalvorson(1965) ทำการศึกษาเมตาบอลิซึมของ PHB และอะซีโตอิน (acetoine) ในเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ T พบว่าการสังเคราะห์ PHB เริ่มต้นขึ้นหลังจากเชื้อหยุดการเติบโต และสามารถสะสม PHB ได้สูงสุดก่อนเกิดการสร้างสปอร์ ซึ่งในระหว่างกระบวนการสร้างสปอร์ PHB จะถูกย่อยสลาย ผลการศึกษาของ Wakisaka และคณะ(1982)สรุปได้ว่า *Bacillus thuringiensis* จะสร้าง PHBเมื่อมีความเข้มข้นของโปแตสเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ และแอมโมเนียมซัลเฟตจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแกรนูล PHB เพิ่มมากขึ้นในสายพันธุ์ 290-1 ต่อมา Chenและคณะ (1991) รายงานผลการศึกษาการสร้างพอลิ3-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆดังนี้ *B. megaterium* DSM 90 *B. laterosporus* DSM335 *B. subtilis* DSM10 *B. sphaericus* DSM20 *B. cereus* DSM31 *B. amyloliquefaciens* DSM7 *B. licheniformis* DSM394 *B. macerans* DSM2892 *B. circulans* DSM1529 *B.thuringiensis* DSM2046 และ *B. mycoides* DSM2048 ใช้วิธีการเพาะเลี้ยง 2 ขั้นตอน โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ขั้นตอนแรกให้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆเติบโตใน

อาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที บ่มเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์แห้งมาล้างด้วยน้ำ จากนั้นนำเซลล์ที่ล้างแล้วถ่ายลงในอาหารที่ขาดไนโตรเจน เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ เมื่อจุลินทรีย์เติบโตในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ สายพันธุ์ต่างๆสามารถสังเคราะห์ PHBได้ในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งปริมาณPHBภายในเซลล์ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนี้อยู่ในช่วง 5-20 % ของความหนาแน่นของเซลล์ แต่เมื่อควบคุมการหมักให้อยู่ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอและจำกัดปริมาณไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถผลิตพอลิเมอร์ได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งปริมาณ PHB ที่ผลิตได้แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมอะซีเตตและ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตลงไปมีผลให้การสังเคราะห์ PHB เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่เติมเพิ่มลงไปทำให้ปริมาณของอะเซติลโค-เอ และ3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโค-เอภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น

รัตนศิริ มุทิตากุล(2538)สามารถคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHB ชนิดใหม่จากจุลินทรีย์ 30 ชนิดที่แยกได้จากตัวอย่างต่างๆ พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BA-019 สามารถสร้างและสะสม PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ จากนั้นศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB พบว่า เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัมต่อลิตร และเติมสารละลาย trace elements 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร *Bacillus* sp. BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้นจากเมื่อเริ่มแยกเชื้อได้ใหม่ 13.21 % เป็น 31.84 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ที่ชั่วโมง 24 ของการเลี้ยงเชื้อ

ปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB

เนื่องจากสมบัติการย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ และผลที่ได้ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสมบัติทางเคมีและกายภาพที่คล้ายกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ทำให้ PHB ได้รับความสนใจนำมาผลิตเป็นพลาสติกเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน แต่อุปสรรคที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับการประยุกต์ใช้ PHB คือต้นทุนของการผลิต PHB ยังสูงกว่าพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีมาก (Byrom,1987;Choiและ Lee,1997) โดยต้นทุนการผลิต PHB เมื่อคำนวณจากพื้นฐานของข้อมูลดังนี้คือ ผลิตด้วยกระบวนการหมักของเชื้อ *A. eutrophus* ด้วยอัตราการ

ผลิต 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในถังหมักแบบ stirred-tank ขนาด 334 ลูกบาศก์เมตร เท่ากับ 5.58 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ในขณะที่พลาสติกสังเคราะห์ เช่น PP,PE และ PS ราคาขายในปัจจุบันเท่ากับ 0.62-0.96 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม (ChoiและLee,1997; Steinbuchel และ Fuchtenbusch,1998) ดังนั้นนักวิจัยหลายคณะจึงได้พยายามที่จะขจัดอุปสรรคดังกล่าวเพื่อให้สามารถลดต้นทุนการผลิต PHB ทางการค้า อันจะทำให้สามารถแข่งขันด้านราคากับพลาสติกสังเคราะห์ได้ วิธีการที่นำมาใช้ในการลดต้นทุนการผลิตPHB ได้แก่ การพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรีย การพัฒนากระบวนการหมักและกระบวนการ recovery ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการผลิต PHB ให้มีต้นทุนต่ำสุดจะประสบผลสำเร็จได้ต้องพิจารณาถึงการออกแบบและกระบวนการที่เกี่ยวข้องทั้งหมดอย่างเป็นระบบ

1.อัตราการผลิต PHB

นิยามของอัตราการผลิต PHB คือ ความเข้มข้นของการผลิต PHB ต่อหน่วยปริมาตรในช่วงเวลาหนึ่ง การวิเคราะห์กระบวนการผลิต PHB ใน *Alcaligenes latus* *Methylobacterium organophilum* และ recombinant *E. coli* (ChoiและLee,1999) แสดงให้เห็นถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อต้นทุนการผลิต PHB ดังตารางที่3

เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการผลิต PHB จาก recombinant *E. coli* โดย 2 กระบวนการที่มีอัตราการผลิต PHB แตกต่างกัน พบว่าเมื่ออัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้นจาก 1.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็น 3.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ต้นทุนการผลิต PHB ลดลงจาก 5.37 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม เหลือ 4.91 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม การเพาะเลี้ยง *A. latus* แบบ fed-batch โดย Wangและ Lee (1997a)ให้อัตราการผลิต PHB สูงสุด 4.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ทำให้ต้นทุนการผลิต PHB ต่ำสุดเพียง 2.6 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ดังนั้นถ้าสามารถผลิต PHB ให้มีอัตราการผลิต PHB สูงจะทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง

ตารางที่3. เปรียบเทียบการผลิต PHB โดยกระบวนการหมักและต้นทุนการผลิตโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ (Choiและ Lee, 1999)

Parameter	*A.latus*[1]	*A.latus*[2]	*E.coli*[3]	*E. coli*[4]	*M. organophilum*[5]
Fermentation					
Culture time (h)	18	20	41	49	70
Cell concentration(g/l)	143	111.7	112	204.3	250
PHB concentration (g/l)	71.4	98.7	81	157.1	130
PHB content (%)	50	88	72.3	77	52
PHB productivity (g/l-h)	3.97	4.94	1.98	3.2	1.86
PHB yield	0.17	0.42	0.29	0.27	0.19
Economic evaluation (US $ / kg)					
Directed-fixed-capital-dependent cost	1.42	0.73	1.31	1.00	1.57
Labor-dependent cost	0.23	0.12	0.21	0.16	0.23
Administration and overhead	0.09	0.05	0.09	0.08	0.11
Raw materials cost	4.94	1.26	2.99	2.97	3.31
Utilities	0.49	0.29	0.42	0.36	0.46
Waste treatment disposal	1.13	0.15	0.35	0.34	1.01
Total production cost [US$ /kg PHB]	8.3	2.6	5.37	4.91	6.69

1=งานวิจัยของ Yamaneและคณะ(1996)

2=งานวิจัยของ Wangและ Lee(1997a)

3=งานวิจัยของ Leeและ Chang(1994)

4=งานวิจัยของ Wangและ Lee(1997b)

5=งานวิจัยของ Kimและคณะ(1996)

2.ปริมาณ PHB

ปริมาณ PHB ส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการ recovery เช่นเดียวกับผลผลิต PHB (PHB yield) โดยส่งผลต่อ recovery yield และความบริสุทธิ์ของ PHB ปริมาณการใช้สารที่ใช้สำหรับย่อยเซลล์ (digesting agent) เพื่อแยกแกรนูล PHB จากเซลล์ที่มีปริมาณ PHB สูงจะน้อยกว่าเซลล์ที่มีปริมาณ PHB ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิต PHB จาก *A. latus* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch(Choiและ Lee,1999) 2 วิธีการ ซึ่งได้จากการทดลองของนักวิจัย 2 กลุ่ม ที่ใช้จุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน ดังนี้ ผลการทดลองของ Yamaneและคณะ(1996) ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 50

% ต่อความหนาแน่นของเซลล์ ผลผลิต PHB 0.17 กรัม PHB ต่อกรัม น้ำตาลซูโครส มีต้นทุนการ recovery เท่ากับ 4.8 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม และจากการศึกษาของ Wang และLee (1997a) ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเป็น 88 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบจำกัดปริมาณไนโตรเจน และได้ผลผลิต PHB สูงถึง 0.42 กรัม PHB ต่อกรัม น้ำตาลซูโครส ทำให้ต้นทุนการ recovery ลดลงเหลือเพียง 0.92 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม แสดงให้เห็นว่าต้นทุนการ recovery ลดลงอย่างมากเมื่อปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น (ChoiและLee,1999) ทั้งนี้เนื่องจากการที่ผลิต PHB ได้ในปริมาณต่ำต้องใช้สารใช้ในการย่อยปริมาณมาก และเพิ่มต้นทุนด้านอุปกรณ์อีกด้วย

3.ราคาแหล่งคาร์บอน และผลผลิต PHB

Yamane(1992,1993)รายงานว่าราคาของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB อย่างมาก ในบรรดาสารอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมัก แหล่งคาร์บอนส่งผลต่อต้นทุนการผลิตมากที่สุด ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้มีมากมายหลายชนิดขึ้นอยู่กับความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต น้ำมัน แอลกอฮอล์ ไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น ประสิทธิภาพของการเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็น PHB ก็มีความสำคัญต่อต้นทุนการผลิตเช่นเดียวกัน ตารางที่4 สรุปราคาของแหล่งคาร์บอนและผลผลิต PHB ตามทฤษฎี (theoretical yield) ซึ่งส่งผลต่อราคาของ PHB

ตารางที่4.ผลของต้นทุนซับสเตรทและผลผลิต PHB ที่มีต่อราคา PHB (Lee,1996b)

Substrate	Approximate price (US$ kg^{-1})	P(3HB) yield [g P(3HB) (g substrate)$^{-1}$]	Substrate cost {US$ [kg P(3HB)]$^{-1}$}
Glucose	0.493	0.38	1.30
Sucrose	0.290	0.40	0.72
Methanol	0.180	0.43	0.42
Acetic acid	0.595	0.38	1.56
Ethanol	0.502	0.50	1.00
Cane molasses	0.220	0.42	0.52
Cheese whey	0.071	0.33	0.22
Hemicellulose hydrolysate	0.069	0.20	0.34

เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร เช่น กากน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท หางเนย(cheese whey) เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส มีราคาต่ำ ดังนั้นแหล่งคาร์บอนเหล่านี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิต PHB (Lee,1996b ; ChoiและLee,1997) แบคทีเรียจำนวนมากสามารถผลิต PHB ได้จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาต่ำเหล่านี้ แต่โดยทั่วไปปริมาณPHB และอัตราการผลิต PHB จะต่ำกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตาม Leeและคณะ(1997) ได้พัฒนาเชื้อ recombinant *E. coli* สายพันธุ์ซึ่งรับยีนสังเคราะห์ PHB จากเชื้อ *A. eutrophus* ให้สะสม PHBปริมาณมากในอาหารที่มีหางนม (whey) เป็นองค์ประกอบ ต่อมา Wongและ Lee(1998) เลี้ยง recombinant *E. coli* นี้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch โดยใช้สารละลายหางนมเป็นสารอาหารป้อนเข้า (feeding solution) สามารถผลิต PHB ได้ 69 กรัมต่อลิตร และความหนาแน่นของเซลล์ 87 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต PHB 1.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ และได้ปริมาณPHBสูงถึง 80 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์

จากการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิต PHB ของ Choiและ Lee(1999) พบว่าถ้าเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสที่มีราคา 0.5 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม เป็นการใช้ hydrolyzed corn starch ที่มีราคา 0.22 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ต้นทุนการผลิต PHB จาก recombinant *E. coli* ซึ่งเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการเดียวกัน จะลดลงจาก 4.91 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม เป็น 3.72 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม หรือต่ำกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 1.19 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม

4.ปัจจัยอื่นๆ

4.1อากาศ

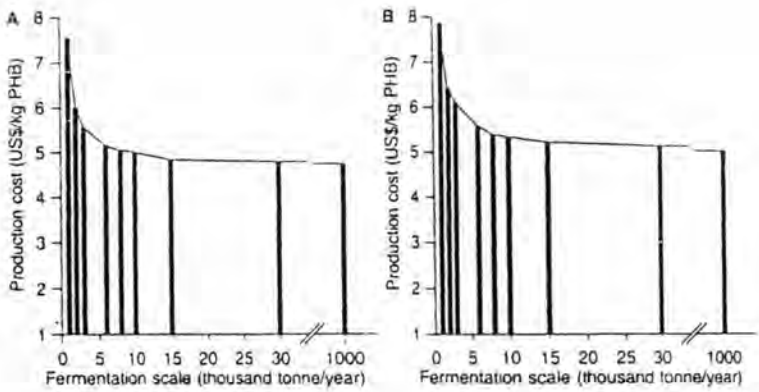
โดยทั่วไปเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียส่วนใหญ่เพื่อการผลิต PHB โดยให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง ปริมาณออกซิเจนเป็นปัจจัยที่จำกัด การให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอเพื่อรักษาสภาพการมีอากาศ(aerobic condition) จะส่งผลต่อต้นทุนการผลิต PHB ด้วย การป้องกันการจำกัดออกซิเจนโดยทั่วไปจำเป็นต้องมีภาชนะที่ทนแรงดันได้ มีอัตราการไหลของก๊าซสูง และมีการเติมอากาศที่มีออกซิเจนมาก ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ (Choiและ Lee,1999) ปัญหานี้แก้ไขได้ถ้าสามารถค้นพบแบคทีเรียซึ่งสามารถผลิต PHB ได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจนน้อย Wangและ Lee(1997b)สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณมากโดยการเลี้ยง recombinant *E. coli* แบบ fed-batch โดยในระยะการสังเคราะห์ PHB ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายถูกรักษาระดับที่ 1-3 % ของอากาศอิ่มตัว สามารถผลิต PHB ได้สูง 157.1 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB 77 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ และมีอัตราการผลิต PHB สูง 3.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

4.2แหล่งไนโตรเจน

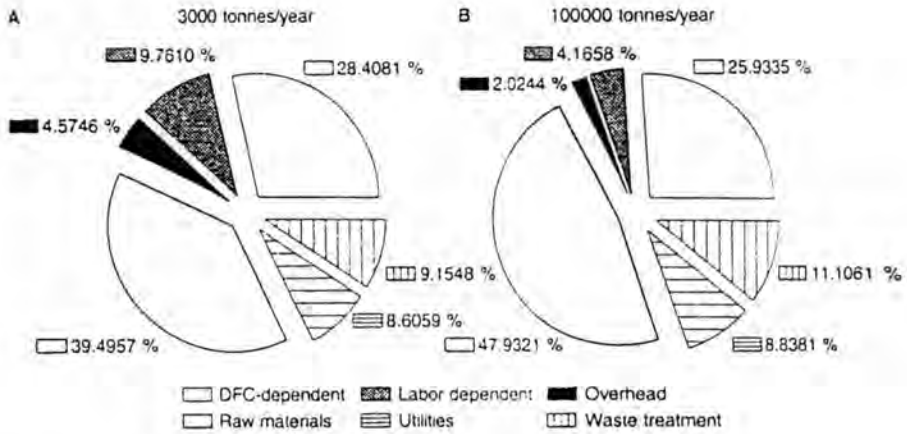
Page(1992) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Azotobacter vinelandii* UWD โดยมีการเติม fish peptone yeast extract tryptone casamino acids bactopeptone หรือ beef extract อย่างใดอย่างหนึ่งในปริมาณเล็กน้อย ผลผลิตPHBต่อคาร์บอนที่ถูกใช้ไปจะเพิ่มขึ้น แหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนเหล่านี้ช่วยเพิ่มแต่การผลิตPHBโดยไม่เพิ่มการเติบโตของเซลล์ ถึงแม้ปริมาณไนโตรเจนเชิงซ้อนเหล่านี้จะถูกใช้เพียงปริมาณเล็กน้อย แต่คุณภาพของแหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนเหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงระยะเวลาในแต่ละปีและสถานที่ที่ผลิต ซึ่งอาจส่งผลให้ผลที่ได้จากกระบวนการหมักเปลี่ยนแปลงไปและคุณภาพของพอลิเมอร์ที่ได้ไม่คงที่ (Choi และ Lee,1999)

4.3ขนาดการผลิต

ราคาของ PHB จะลดลงเมื่อขนาดการผลิตเพิ่มขึ้น(Choi และLee,1997 ; Choi และ Lee,1999) ผลของขนาดการผลิตต่อราคา PHB แสดงดังรูปที่4 เมื่อขนาดการผลิตเปลี่ยนแปลงต้นทุนการผลิตต่างๆจะเปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยสัดส่วนของต้นทุนด้านวัตถุดิบเพิ่มขึ้นมากที่สุด คิดเป็นประมาณ 50 % ของต้นทุนทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่5 ดังนั้นต้นทุนด้านวัตถุดิบจึงมีความสำคัญมากต่อการผลิต PHB



รูปที่4.แสดงผลของขนาดการผลิตต่อราคาของ PHB(ก) จากเชื้อ *A. eutrophus* (ข) จากเชื้อ recombinant *E. coli* (Choiและ Lee, 1997)



รูปที่5. แสดงต้นทุนด้านต่างๆเมื่อขนาดการผลิต PHB เพิ่มขึ้น (Choiและ Lee, 1997)

4.4กระบวนการ recovery

ภายหลังจากการผลิต PHB โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆด้วยกระบวนการหมัก จำเป็นต้องมีการ recovery เพื่อแยก PHB ออกจากเซลล์ วิธีการ recovery และสารที่ใช้ในกระบวนการเหล่านี้ ส่งผลต่อสมบัติบางประการและความบริสุทธิ์ของ PHB รวมทั้งยังส่งผลต่อต้นทุนการผลิต PHB อีกด้วย ดังนั้นวิธีการย่อยเพื่อแยกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแบบไม่ซับซ้อนโดยใช้สารเคมีที่มีราคาถูก จึงเป็นกระบวนการ recovery ที่มีประสิทธิภาพและคุ้มทุน ปัจจุบัน Choiและ Lee (1998) ได้พัฒนาวิธีการย่อยด้วยด่างอย่างง่าย เพื่อแยก PHB จาก recombinant *E. coli* ซึ่งทำได้โดยนำ

เซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ที่มีปริมาณ PHB 77 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์มาทำให้เซลล์แตกด้วย 0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง PHBที่ได้มีความบริสุทธิ์ 98.5 % ซึ่งต้นทุนการผลิต PHB โดยใช้วิธีการนี้คิดเป็น 75 % ของต้นทุนการผลิต PHB เมื่อใช้วิธีการแบบ surfactant-hypochlorite digestion

กระบวนการผลิต PHB

มีการวิจัยจำนวนมากที่รายงานถึงการปรับปรุงหรือการพัฒนากระบวนการผลิต PHB ให้มีความเหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต รวมทั้งการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และการใช้แบคทีเรียชนิดใหม่ ทั้งนี้เพื่อให้สามารถลดต้นทุนการผลิต PHB ให้ต่ำสุด อันจะส่งผลต่อการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งทำให้สามารถแข่งขันด้านราคากับพลาสติกสังเคราะห์ที่ใช้ในปัจจุบันได้ (Lee,1996b ; Braunegg และคณะ,1998) การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch เป็นกระบวนการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งหลักการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบนี้คือ มีการเติมสารอาหารในระหว่างการหมัก มีผลทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง และได้ผลผลิตสูง Suzuki และคณะ (1986a)ใช้การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch 2 ขั้นตอนเลี้ยงเชื้อ methylothroph เพื่อการผลิต PHB การป้อนแหล่งคาร์บอนซึ่งใช้เมทานอลทำโดยการใช้ระบบควบคุมด้วย porous teflon tubing sensor ในขั้นตอนแรกของการเลี้ยงเชื้อมีการเติมสารอาหารชนิดอื่นๆรวมทั้งแหล่งคาร์บอน เพื่อให้เซลล์มีการเติบโตสูงสุด จากนั้นจึงหยุดการเติมสารอาหารชนิดอื่นแล้วเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนในขั้นตอนการสะสม PHB ภายในเซลล์ การเพาะเลี้ยงแบบนี้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงถึง 206 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 136 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 66 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ แต่ต้องใช้ระยะเวลานาน 175 ชั่วโมง Suzuki และคณะ(1986b) ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสารอาหารป้อนเข้า พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนคงที่ส่งผลควบคุมทั้งปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB จำเพาะ การควบคุมอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนแบบอัตโนมัติโดยให้อัตราส่วนเพิ่มขึ้นในช่วงการสะสม PHB ทำให้การผลิต PHB เกิดขึ้นได้สูงที่สุด เมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ระดับความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต PHB ได้ความเข้มข้นสูงถึง 149 กรัมต่อลิตร ที่ 170 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ Kim และคณะ(1992) รายงานการผลิต PHB โดยการเพาะเลี้ยง recombinant *E. coli* แบบ fed-batch โดยใช้เทคนิค pH-stat ควบคุมการป้อนสารอาหาร ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส yeast extract และ tryptone การเพาะเลี้ยง

แบคทีเรียชนิดนี้ด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถผลิต PHB ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 88.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณPHB 76.2 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ Shimizu และคณะ(1993) ศึกษาการผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* H-16 แบบ fed-batch โดยใช้กรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการป้อนกรดบิวทิริกแบบคงที่เพื่อให้มีความเข้มข้นของกรดเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร และควบคุม pH เท่ากับ 8.0 ได้อัตราการผลิต PHB จำเพาะ ผลผลิต PHB และปริมาณ PHB ภายในเซลล์สูงที่สุด Kim และคณะ(1994)ศึกษาการผลิต PHB โดยการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* แบบ fed-batch ควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 10-20 กรัมต่อลิตร โดย 2 วิธีการ คือ ใช้ข้อมูลปริมาณก๊าซที่ออกจากระบบที่ได้โดยวัดจาก mass spectrophotometer และใช้ on-line glucose analyzer รักษาระดับออกซิเจนละลายให้มากกว่า 20 % ของอากาศอิ่มตัว ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch 2 ขั้นตอนด้วยการจำกัดปริมาณไนโตรเจน ได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 71 และ 92 กรัมต่อลิตร เมื่อจำกัดไนโตรเจนเมื่อความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 30 และ 55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ถ้าจำกัดไนโตรเจนเมื่อความหนาแน่นของเซลล์สูงเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 121 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าจำกัดปริมาณไนโตรเจนช้าจนกระทั่งความหนาแน่นของเซลล์สูงถึง 90 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB และอัตราการผลิตที่ได้จะลดต่ำลง Lee และ Chang(1995) ศึกษาการผลิต PHB โดยการเพาะเลี้ยง recombinant *E. coli* แบบ fed-batch ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารโดยใช้เทคนิค pH-stat และควบคุมออกซิเจนละลายให้สูงกว่า 10 % ของอากาศอิ่มตัว โดยมีการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เมื่อจำเป็น และมีการศึกษาเปรียบเทียบการผลิต PHB โดยใช้สารอาหารรูปแบบต่างๆกัน พบว่าเมื่อใช้อาหารชนิด semidefined medium สามารถได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 81 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 41 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อTanaka และคณะ(1995) รายงานการผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* IO-1 และ *A. eutrophus* แบบ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเลี้ยงเชื้อ *L. Lactis* Io-1 ให้ผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส จากนั้นมีการแยกแบคทีเรียดังกล่าวออก แล้วเติมเซลล์ *A. eutrophus* ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เกิดการผลิต PHB พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ที่มีการเติมกรดแลคติกเพื่อรักษาความเข้มข้นของกรดให้อยู่ที่ 3 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 41 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 28.7 กรัมต่อลิตรภายใน 17 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ช่วยลดผลการยับยั้งการเติบโตจากความเป็นพิษของกรดแลคติกต่อเซลล์ Kim และคณะ(1996)ศึกษาการผลิต PHB จาก *Methylobacterium organophilum* ภายใต้การจำกัดปริมาณโปแตสเซียม โดยใช้การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารแบบ on-line โดยใช้ porous teflon tubing sensor และมีการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์ผสมกับอากาศลงไปในระบบการเลี้ยงเชื้อ เพื่อแก้ปัญหาภาวะการจำกัดออกซิเจนละลายที่ความหนาแน่นของเซลล์สูง พบว่าได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร และได้ความ

เข้มข้นของ PHB เท่ากับ 130 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิต PHB เท่ากับ 1.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Yamane และคณะ(1996)รายงานการเพิ่มอัตราการผลิต PHB โดยการเพาะเลี้ยง *A. latus* ด้วยเทคนิค high cell density fed-batch คณะผู้วิจัยนี้ใช้ pH-stat เป็น feedback parameter เพื่อควบคุมการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบ ซึ่งลักษณะการทำงานเหมือนกับ DO-stat สารอาหารป้อนเข้าประกอบด้วย สารละลายซูโครสเข้มข้น 900 กรัมต่อลิตร สารละลายแอมโมเนีย 28 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแร่ธาตุต่างๆ ภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อดังนี้ ควบคุมอุณหภูมิที่ 33 องศาเซลเซียส pHเท่ากับ 6.5 และควบคุมค่าออกซิเจนละลายให้สูงกว่า 1.0 ppm เมื่อไม่สามารถรักษาระดับของออกซิเจนละลายได้ที่ความหนาแน่นของเซลล์สูง จะมีการเติมก๊าซออกซิเจน 95 % ซึ่งผลิตจาก oxygen concentrator เพื่อผสมในอากาศที่ป้อนเข้าสู่ระบบ ผลการทดลองพบว่าสามารถได้ ความเข้มข้นของ PHB สูงภายในเวลา 18 ชั่วโมงเมื่อใช้ความเข้มข้นกล้าเชื้อ 13.7 กรัมต่อลิตร คือได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 142 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 68.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 50 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ และมีอัตราการผลิต PHB 3.97 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Lee และคณะ(1997) ศึกษาหาอัตราการป้อนสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch พบว่าการป้อนสารอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง 700 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 7% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 141 กรัมต่อลิตร และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 105 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 40 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHB สูงเท่ากับ 2.63 กรัมต่อลิตร Ryu และคณะ(1997)สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณสูงจาก *A. eutrophus* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูง ภายใต้การจำกัดปริมาณฟอสเฟตในถังหมักขนาด 60 ลิตร โดยมีการเติมสารอาหารด้วยเทคนิค DO-stat คือใช้ค่าความเข้มข้นออกซิเจนละลายเป็น feedback parameter นั่นคือเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดค่าออกซิเจนละลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงมีการเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 800 กรัมต่อลิตรลงไปในถังหมัก จากผลการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตที่เหมาะสมคือ 5.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง 281 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณของ PHB 232 กรัมต่อลิตร คิดเป็น PHB 80 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ อัตราการผลิตPHB สูงเท่ากับ 3.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปี 1997 Wang และ Lee สามารถผลิต PHB ด้วยอัตราการผลิตและปริมาณสูง โดยการเพาะเลี้ยง *A. latus* ด้วยเทคนิคเช่นเดียวกับ Yamane และคณะ(1996) แต่มีข้อแตกต่างกันคือมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนเมื่อมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 76 กรัมต่อลิตร มีการรักษาระดับของค่าออกซิเจนละลายให้สูงกว่า 40 % ของอากาศอิ่มตัว โดยการควบคุม agitation speed แบบอัตโนมัติ และมีการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์ที่อัตราการไหลของก๊าซคงที่ที่ 4 ลิตรต่อนาที ผลการทดลองสรุปได้ว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 20 ชั่วโมง สามารถผลิต PHB ได้ 98.7 กรัมต่อลิตร ความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ 111.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็น

ปริมาณ PHB เท่ากับ 88 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ อัตราการผลิต PHB สูงเท่ากับ 4.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Liu และคณะ(1998) ผลิต PHB โดยการเลี้ยง recombinant *E. coli* แบบ fed-batch ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กากน้ำตาลจากหัวบีทเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กล้าเชื้อ 10 %ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส pHเท่ากับ 6.8 และรักษาระดับของค่าออกซิเจนละลายให้สูงกว่า 20 % ของอากาศอิ่มตัว ใช้ pH-DO-stat เป็น feedback parameter สารอาหารป้อนเข้าประกอบด้วยกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 31.5 ชั่วโมง ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 39.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHBเท่ากับ 80 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ และอัตราการผลิต PHBเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Wong และLee(1998)ศึกษาการผลิต PHB จากหางนมโดยการเพาะเลี้ยง recombinant *E. coli* แบบ fed-batch โดยใช้ เทคนิค pH-stat ควบคุมการป้อนสารอาหาร และควบคุมออกซิเจนละลายให้สูงกว่า 30 % ของอากาศอิ่มตัว โดยมีการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เมื่อจำเป็น พบว่าเมื่อใช้สารละลายหางนมที่มีแลคโตสเท่ากับ 210 กรัมต่อลิตร เป็นสารอาหารป้อนเข้า ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 87 กรัมต่อลิตร และได้ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 69 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 80 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ Tsuge และคณะ(1999)ศึกษาการเติมกรดแลคติกที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดยการเลี้ยง *A. eutrophus* แบบ fed-batch พบว่าการใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมลในขั้นตอนการเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 โมลต่อโมลระหว่างการสะสม PHB สามารถผลิตเซลล์ได้เท่ากับ 103 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณ PHB เท่ากับ 57.6 % ต่อความหนาแน่นของเซลล์ จากการวิจัยของผู้วิจัยคณะต่างๆส่วนใหญ่พบว่าใช้การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ fed-batch โดยใช้เทคนิค pH-stat ควบคุมการป้อนสารอาหาร เป็นวิธีการผลิต PHB ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งการผลิต PHB ให้มีประสิทธิภาพยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น ภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ องค์ประกอบของสารป้อนเข้า และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นต้น

กระบวนการหมักจะสิ้นสุดเมื่อใดเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาให้เหมาะสม บางกรณีการหมักควรหยุดเมื่ออัตราการผลิตสูงที่สุด เนื่องจากอาจสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่าเดิม แต่อัตราการผลิตทั้งหมดอาจต่ำลง กรณีเช่นนี้กระบวนการหมักจะมีประสิทธิภาพ ถ้าปริมาณ PHB ที่ได้เพิ่มขึ้นด้วย เพราะมีผลให้กระบวนการ recovery และการทำให้พอลิเมอร์บริสุทธิ์ทำได้ง่ายขึ้น (Lee,1996b)

กระบวนการหมักแบบ batch

กระบวนการหมักแบบ batch เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เติบโตในระบบปิด ซึ่งส่วนใหญ่ทำในขวดเขย่าหรือถังหมักที่มีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเติบโต และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักแบบนี้ไม่มีการเติมสารอาหาร เซลล์จะเติบโตจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นหมดไป หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เนื่องจากการสะสมสารพิษ หรือ pH เปลี่ยนแปลง เป็นต้น การเติบโตของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ batch แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้

1.ระยะการฟักตัว (lag phase) ระยะนี้เริ่มต้นเมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่เซลล์ยังไม่มีการเติบโต เนื่องจากเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว เพื่อให้สามารถเติบโตได้ในสิ่งแวดล้อมใหม่ ระยะนี้จะใช้เวลานานเท่าใดขึ้นกับลักษณะการเติบโตของกล้าเชื้อ ในระดับอุตสาหกรรมต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต

2.ระยะการเติบโตแบบทวีคูณ (log หรือ exponential phase) เป็นระยะที่เซลล์เริ่มมีการเติบโตเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนกระทั่งคงที่ ระยะนี้เซลล์มีอัตราการเติบโตแบบทวีคูณ

3.ระยะการเติบโตคงที่ (stationary phase) เมื่อสิ้นสุดระยะการเติบโตแบบทวีคูณ อัตราการเติบโตจะลดลงจนกระทั่งเป็นศูนย์ ระยะนี้ความหนาแน่นของเซลล์ค่อนข้างคงที่ และไม่มีการเติบโตของเซลล์ ซึ่งถึงแม้ว่าเซลล์จะมีการเติบโต แต่อัตราการเติบโตเท่ากับอัตราการตาย การที่เซลล์หยุดการเติบโตเนื่องจากสารอาหารจำเป็นหมดไป การสะสมสารพิษ หรือสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลง เช่นค่า pH เซลล์ที่ดำรงชีพได้ในระยะนี้ เนื่องจากเหตุผลหลายประการ คือ ภายในเซลล์มีพอลิเมอร์บางประเภทสะสมอยู่ ซึ่งเซลล์สามารถนำมาใช้เป็นซับสเตรทได้ หรือมีการพัฒนารูปแบบเซลล์ให้ทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การสร้างสปอร์

4.ระยะการเติบโตแบบลดลง (decline หรือ death phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการตายมากกว่าอัตราการเติบโต (Scragg,1991 ; Snape และคณะ,1995 ; AsenjoและMerchuk,1995)

การเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะ log phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

เซลล์ที่สะสม = เซลล์เติบโต-เซลล์ออก-เซลล์ตาย

$$dX/dt = \mu X - (F/V \cdot X) - aX \qquad (1)$$

เมื่อเซลล์ไม่ถูกนำออกจากระบบ และ $a >> \mu$ เขียนสมการ (1) ใหม่ได้ คือ

$$dX/dt = \mu X \qquad (2)$$

เมื่อ X = ความเข้มข้นมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) (ต่อชั่วโมง)

F = อัตราการไหล (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ลิตร)

a = อัตราการตายจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

เมื่ออินทิเกรตสมการ (2) จะได้

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \qquad (3)$$

เมื่อ X_0 = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพเริ่มต้น

X_t = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา t ชั่วโมง

e = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (3) จะได้

$$\mu = [\ln X_t - \ln X_0] / t \qquad (4)$$

Yp/s คือผลผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป เป็นพารามิเตอร์สำคัญที่แสดงถึงประสิทธิภาพการเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ Yp/s สามารถหาได้จากสมการ

$Yp/s = \Delta P / \Delta S$

เมื่อ ΔP = ผลต่างของผลิตภัณฑ์

ΔS = ผลต่างของซับสเตรทที่ถูกใช้ไป

อัตราการผลิต (productivity) ของกระบวนการหมักแบบ batch แสดงค่าในเทอมของกรัมผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นต่อหน่วยปริมาตรต่อหน่วยเวลา หรือ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

กระบวนการหมักแบบ fed-batch

กระบวนการหมักแบบ fed-batch คือกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยมีการเติมสารอาหาร 1 ครั้ง หรือมากกว่าลงในภาชนะที่ใช้ในการหมักในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่มีการนำของเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อออกจากระบบจนสิ้นสุดการหมัก ปริมาตรของของเหลวในกระบวนการหมักแบบนี้จะเพิ่มขึ้น ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้กระบวนการหมักแบบนี้ ความเข้มข้นของสารอาหารป้อนเข้าในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถควบคุมได้โดยการเปลี่ยนอัตราการป้อนเข้า ดังนั้นกระบวนการ

หมักแบบ fed-batch จึงได้เปรียบกว่ากระบวนการหมักแบบ batch เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารเปลี่ยนแปลง มีผลทำให้ผลผลิตที่ได้ หรือ อัตราการผลิตของเมตาโบไลท์ที่ต้องการให้เพิ่มสูงขึ้น (AsenjoและMerchuk,1995)

ปัจจัยที่ส่งผลให้กระบวนการหมักแบบ fed-batch มีประสิทธิภาพมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch

1. สามารถใช้สาร เช่น เมทานอล เอทานอล กรดอะซีติก และสารประกอบอะโรมาติก ซึ่งยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์แม้ว่าใช้ที่ความเข้มข้นต่ำเป็นสารอาหารเลี้ยงเชื้อได้ กระบวนการหมักแบบ fed-batch สามารลดผลการยับยั้งได้โดยการเติมสารอาหารดังกล่าวครั้งละน้อยๆ ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารไม่สูงเกินไป

2. สามารถเพาะเลี้ยงแบบให้ความหนาแน่นของเซลล์สูง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบ batch ที่มีความเข้มข้นของซับสเตรทสูง อาจจะไปยับยั้งการเติบโตของเซลล์ ทำให้ได้ความเข้นข้นเซลล์ต่ำ

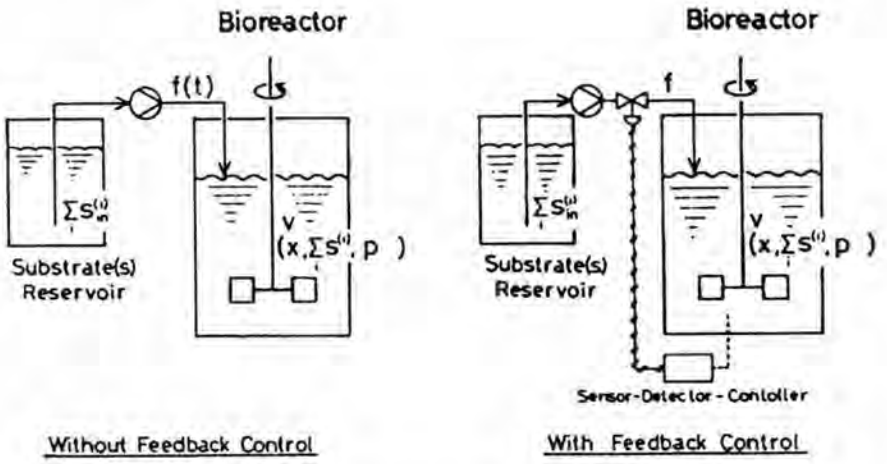
3. เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยแหล่งคาร์บอนที่ให้พลังงานอย่างรวดเร็ว เช่น กลูโคส อาจจะเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ เป็นสาเหตุให้เมตาบอลิซึมของแหล่งพลังงานเกิดขึ้นได้ช้าลง ซึ่งเรียกการยับยั้งแบบนี้ว่า catabolite repression ดังนั้นกระบวนการหมักแบบ fed-batch สามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้ต่ำได้โดยการควบคุมการป้อนเข้า มีผลให้กระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้ง

4. สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์สารจำเป็นบางชนิดได้(auxotrophic matants) ให้เติบโตภายใต้การควบคุมการป้อนสารอาหารที่จำเป็น เพื่อให้สามารถสะสมเมตาบอไลท์ที่ต้องการในปริมาณมากได้ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้ การให้สารอาหารที่จำเป็นในปริมาณมากเกินไปส่งผลให้มีการเติบโตสูงแต่การสะสมผลิตภัณฑ์ต่ำ เนื่องจากการยับยั้งแบบ feedback inhibition และ/หรือ end-product repression

5.สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารที่ต้องการเมื่อเปลี่ยนภาวะการเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch 2 ขั้นตอน

การจัดจำแนกกระบวนการหมักแบบfed-batch โดยอาศัยเทคนิคการป้อนสารอาหาร

จุดประสงค์หลักของการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch คือการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นวิธีการป้อนสารอาหารให้เหมาะสมจะมีผลต่อประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง สามารถแบ่งกระบวนการหมักแบบนี้ออกเป็น 2 ประเภท คือ แบบ with feedback control และ without feedback control ดังแสดงในรูป 6



รูปที่6. แสดงเทคนิคการป้อนสารอาหารในการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch เมื่อ i=1 แสดงถึงการป้อนสารอาหารชนิดเดียว เมื่อ i >1 แสดงถึงการป้อนสารอาหารมากกว่า 1 ชนิด (AsenjoและChuck , 1995)

1.แบบ without feedback control

กระบวนการหมักแบบนี้อัตราการป้อนเข้าจะเปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยงตามข้อมูลที่ได้มีการศึกษามาก่อน ส่วนใหญ่การเพาะเลี้ยงแบบนี้ในยุคเริ่มต้นจะมีการป้อนสารอาหารเป็นช่วง เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย การป้อนสารอาหารเป็นช่วงที่มีความถี่ให้ผลที่มีลักษณะใกล้เคียงกับการป้อนสารอาหารแบบต่อเนื่อง

2.แบบ with feedback control

กระบวนการหมักแบบ fed-batch ที่ใช้เทคนิคแบบนี้ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.1 with indirect feedback control

กระบวนการหมักแบบนี้ ใช้พารามิเตอร์ที่สามารถสังเกตได้ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับลักษณะของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ พารามิเตอร์ที่ใช้เช่น ค่าออกซิเจนละลาย

ค่า pH ความเข้มข้นของเมตาบอไลท์ และความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ในกรณีของ pH แบ่งออกได้เป็น 2 วิธีการคือ low limit เมื่อ pH มีแนวโน้มลดลงระหว่างการเพาะเลี้ยง และ high limit เมื่อ pH มีแนวโน้มสูงขึ้นในระหว่างการหมัก จะมีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบ

2.2 with direct feedback control

ความเข้มข้นของสารอาหารป้อนเข้าในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกวัดแบบต่อเนื่องหรือแบบเป็นช่วงๆ ซึ่งข้อมูลที่ได้ใช้เป็น feedback parameter โดยตรง กระบวนการหมักแบบนี้จำเป็นต้องมีการตรวจวัดความเข้มข้นของสารป้อนเข้าที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยระบบการวัดด้วยเซนเซอร์ (sensor detector system) ซึ่งมีการวิจัยและคิดค้นไบโอเซนเซอร์หลายชนิดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับระบบดังกล่าว ถ้าสารอาหารที่ใช้เป็นสารป้อนเข้าเป็นสารระเหย เช่น แอลกอฮอล์ สามารถใช้กับ tubing sensor ได้ดี

กระบวนการหมักแบบ fed-batch ระดับอุตสาหกรรมจะประยุกต์ใช้การป้อนสารอาหารแบบต่างๆ ตารางที่ 6 สรุปการประยุกต์ใช้เทคนิคแบบต่างๆที่ใช้สำหรับการควบคุมการป้อนเข้า

ตารางที่ 6. การประยุกต์ใช้ดัชนีควบคุมสำหรับกระบวนการหมักแบบ fed-batch

	C source	Single (nonvolatile)	Complex (nonvolatile)	Single (volatile)	Complex (volatile)
Index	N source	NH_4^+	Organic N (+ NH_4^+)	NH_4^+	Organic N (+ NH_4^+)
DO		A	B	A	B
Tubing method		D	D	A	A
pH (low limit)		C	D	C	D
pH (high limit)		B	A	B	A
Turbidity		A	A	A	A

A = excellent; B = good; C = not bad; D = inapplicable (AsenjoและChuck , 1995)

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความหนาแน่นของเซลล์

สำหรับเซลล์ :

เซลล์ที่สะสม = เซลล์ที่เจริญ

ที่ dt ใดๆ

$$VdX = \mu VX \qquad (5)$$

หารด้วย Vdt ตลอด :

$$dX/dt = (\mu - F/V) X \qquad (6)$$

$$dX/dt = (\mu - D) X \qquad (7)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลของสารอาหารที่ป้อนเข้ามา(ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรของน้ำหมักในเครื่องปฏิกรณ์ (ลิตร)

X = ความหนาแน่นของเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ (กรัมต่อลิตร)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ณ จุดที่ อัตราการเจือจาง (D) น้อยกว่า μ_{max} สารอาหารที่เติมลงไปถูกใช้จนสมบูรณ์ ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพคงที่ ($dX/dt = 0$) ทำให้ $\mu = D$ แต่เมื่อเวลาผ่านไปปริมาตรของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้น เพราะไม่มีการดึงน้ำหมักออกจากระบบ ทำให้ค่าอัตราการเจือจางลดลง เนื่องจาก $D = F/V$ และเมื่อเวลาผ่านไป $V = V + Ft$

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของสารอาหาร

สำหรับสารอาหาร :

สารอาหารที่สะสม = สารอาหารที่เติม – สารอาหารที่ถูกใช้ไป

ที่ dt ใดๆ :

$$VdS = F.S_R - V\mu X/Y_{x/s}\, dt \qquad (8)$$

หารด้วย Vdt ตลอด :

$$dS/dt = F.S_R - \mu X/Yx/s \qquad (9)$$

เมื่อ S = ความเข้มข้นสารอาหารเริ่มต้นในถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

S_R = ความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมลงไป (กรัมต่อลิตร)

$Y_{x/s}$ = สัมประสิทธิ์ผลผลิตมวลชีวภาพเมื่อเทียบกับสารอาหารที่ใช้ (biomass yield coefficient) (กรัมความหนาแน่นของเซลล์ต่อกรัมสารอาหารที่ใช้)

เมื่อสารอาหารที่ใช้เติมหมด ($dS/dt = 0$) จะได้

$$F.S_R = \mu X/Yx/s \qquad (10)$$

เรียกภาวะนี้ว่า Quasi-steady state (Whitaker , 1980)

การผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม

ปี 1976 บริษัท Imperial Chemical Industries(ICI) ประเทศอังกฤษเริ่มให้ความสนใจการวิจัยเกี่ยวกับ PHB เนื่องจากสมบัติของ PHB ที่สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ และมีความสามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต การพัฒนาการผลิตเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีการจดสิทธิบัตรการผลิต PHB ช่วงต้นของทศวรรษที่ 80 (Braunegg และคณะ ,1998) บริษัท ZENECA Bio Products ซึ่งเป็นบริษัทในเครือ ICI ผลิต PHB และ PHBV ทางการค้า โดยการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* แบบ fed-batch

หน่วยวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของ Biotechnologisch Forschungsgesellschaft (btF,Austria) ได้พัฒนากระบวนการผลิต PHB ปริมาณ 1 ตัน ภายในเวลา 1 สัปดาห์ ในถังหมักขนาด 15 ลูกบาศก์เมตร (Lee, 1996b)

บริษัท Chemie Linz ประเทศออสเตรีย ผลิต PHB ทางการค้า โดยการเพาะเลี้ยง *A. latus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เติบโตได้รวดเร็วและสามารถสังเคราะห์ PHB ได้ปริมาณสูงในระหว่างการเติบโตตามปกติ (Lee,1996b ; Braunegg และคณะ,1998)

ตารางที่5. สรุปการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม (Lee, 1996a)

Company	**Areas of interest**
Berlin Packaging Corp.(USA)	Marketing , sales and distribution of ZENECA 's BIOPOL Selling bottles made from BIOPOL to hair care company
Bioscience Ltd.(Finland)	Medical applications of PHAs
BioVentures Alberta Inc. (Canada)	Production of PHA by recombinant *Escherichia coli*
Metabolix,Inc.(USA)	Production of PHA by transgenic plants Licensing technology and joint ventures
Monsanto(USA)	Production of PHA by transgenic plants (rapeseed and soybean)
Polyferm,Inc.(Canada)	Production of PHA from cheap substrate (hemicellulose) Production of PHA by *Pseudomonas cepacia* from xylose
ZENECA Bio Products(UK)	Production of PHB and PHBV(BIOPOL) by fed-batch culture of *A. eutrophus*
ZENECA Seeds (UK)	Production of PHA by transgenic plants (rapeseed)

การประยุกต์ใช้ PHA

สามารถประยุกต์ใช้ PHA ได้หลายแนวทาง เนื่องจากสมบัติที่ดีในด้านต่างดังกล่าวมาแล้วข้างต้นหลายประการ

1.การประยุกต์ใช้ทางการเกษตร

-ใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มยาฆ่าแมลง ยาปราบวัชพืชหรือปุ๋ย ให้ค่อยๆถูกปล่อยออกมาทีละน้อยๆ เป็นเวลานาน (Lee,1996a ; Brandlและคณะ,1990)

-ใช้ทำแหจับปลา และอุปกรณ์ทางการเกษตรอื่นๆ (Doi ,1990 ; Brauneggและคณะ,1998)

2.การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ (Doi,1990 ; SteinbuchelและFuchtenbusch,1998)

-ใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา ฮอร์โมน

-ใช้ทำไหมเย็บแผล เข็มเย็บแผล

-ใช้ทำแผ่นกระดูก และข้อต่อกระดูก

-ใช้ทำหลอดเลือดเทียม (blood vessel replacements)

3.การประยุกต์ใช้งานด้านอื่นๆ (Doi,1990 ; Lee,1996a ; Brandlและคณะ,1990 ; Madisonและ Huisman,1999 ; Leeและคณะ,1999)

-ใช้เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์ เช่น ขวดแชมพู ถุงพลาสติก และแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร

-ใช้ทำวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง จำพวกผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับสุขอนามัย เช่น ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย

-ใช้ทำด้ามปากกา ที่วางลูกกอล์ฟ

-ใช้ PHA เป็นสารตั้งต้นในการผลิต R-(-)-hydroxycarboxylic acids ซึ่งสามารถใช้เป็น chiral building blocks สำหรับสังเคราะห์ fine chemicals เช่นยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฟีโรโมน เนื่องจากการสังเคราะห์ R-(-)-hydroxycarboxylic acids ด้วยวิธีทางเคมีทำได้ยากและมีต้นทุนสูง

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

จุลินทรีย์สามารถสร้างและสะสม PHB ซึ่งเป็นไบโอพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พอลิเมอร์ที่ได้มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก และเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์โดยวิธีทางชีวภาพ เมื่อ PHB ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีเอสเทอเรส(esterase) และดีพอลิเมอเรส (depolymerase) ได้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก ดังนั้นการผลิต PHB เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์บางประเภทที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีสามารถลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ในระดับหนึ่ง และมีการนำไปประยุกต์ใช้ด้านการเกษตร และใช้เป็นวัสดุชีวภาพในทางการแพทย์ รวมทั้งยังสามารถนำ PHB หรือ PHA อื่นๆ ไปเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตสารเคมีในกลุ่ม R-(-)-hydroxycarboxylic acids บริสุทธิ์ ซึ่งสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีทำได้ยากและไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจอีกด้วย ในปัจจุบัน PHB ยังมีราคาสูงเนื่องจากต้นทุนในการผลิตสูง ซึ่งสาเหตุประการหนึ่ง คือ ผลผลิต PHB ยังอยู่ในเกณฑ์ต่ำ การเพิ่มปริมาณ PHB ทำได้โดยการเพิ่มปริมาณเซลล์รวมที่ได้จากการเติบโตโดยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch นอกจากนี้ทำให้อัตราการผลิต PHB สูงขึ้น ซึ่งช่วยให้เวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อน้อยลง การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง ยังช่วยลดต้นทุนการ recovery และการบำบัดของเสียอีกด้วย (Yamaneและคณะ,1996) รัตนศิริ มุทิตากุล(2538)ได้แยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ คือ BA-019 ซึ่งผลิต PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นที่ศึกษา และจัดจำแนกชนิดว่าเป็น *Bacillus* sp. และได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมได้แก่แอมโมเนียมซัลเฟต และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้แก่ ซูโครส และกากน้ำตาล

การวิจัยนี้มีความมุ่งหมายที่จะเพิ่มปริมาณการผลิต PHB โดยการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบ fed-batch โดยใช้กากน้ำตาลซึ่งมีราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งศึกษาแหล่งไนโตรเจนราคาถูกเพื่อใช้ในการผลิต โดยให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง และได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น ทั้งนี้จะมีผลให้ราคาต้นทุนการผลิตต่ำลง

วัตถุประสงค์

หาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในถังหมัก เพิ่มผลผลิตของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ PHB โดยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch เพื่อให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูง และเพิ่มอัตราการผลิต PHB

ขั้นตอนการวิจัย

1.ศึกษาผลของปัจจัยต่างๆและหาภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิต PHBของ *Bacillus* sp. BA-019

2.เพิ่มปริมาณการผลิต PHB ให้สูงขึ้น โดยให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้น โดยการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบ fed-batch โดยการเติมสารอาหารซึ่งมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมและการเติมแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการผลิต PHB

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูง และเพิ่มอัตราผลิต PHB ของ *Bacillus* sp. BA-019 โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบ fed-batch และใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก คือ กากน้ำตาลและยูเรีย ซึ่งจะสามารถนำผลการศึกษาที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิต มีผลให้พอลิเมอร์ชนิดนี้มีราคาต้นทุนการผลิตถูกลง ทำให้มีความเป็นไปได้ในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้จากแบคทีเรีย เพื่อทดแทนการใช้พลาสติกสังเคราะห์บางชนิด และนำไปประยุกต์ใช้ด้านอื่นๆด้วย