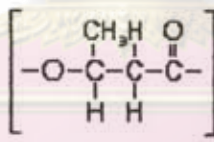
บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ความเป็นมา

พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) และเป็นเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) ในสภาพธรรมชาติเป็นสารประเภท aliphatic polyester ซึ่งพบว่ามีการสังเคราะห์และสะสมไว้อยู่ภายในแกรนูล (granule) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์หลายชนิด

PHB เป็นพอลิเมอร์ของกรดไขมัน ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของกรดไฮดรอกซีบิวทิริค (3-hydroxybutyric acid) มาต่อกันเป็นสายยาวโดยเฉลี่ยตั้งแต่ 23,000-25,000 หน่วย ดังนี้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ PHB

มีจุดหลอมเหลว 180 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำหนักโมเลกุลจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ภาวะการเลี้ยงเชื้อ และวิธีการสกัด โดยที่แกรนูลจะมีขนาดประมาณ 0.2-0.5 ไมโครเมตร และมีเยื่อแผ่นห่อหุ้มหนา 2 นาโนเมตร ซึ่งประกอบด้วย ไขมันและโปรตีน 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักของแกรนูล ตามลำดับ

PHB ได้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี 1926 (Lemoigne,1926) โดยที่ PHB จะทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนและพลังงาน (Carbon & Energy reserve material) (Dawes และ Senior,1973; Holmes,1985; Byrom,1987) ในการผลิต PHB ของจุลินทรีย์ โดยทั่วไป พบ

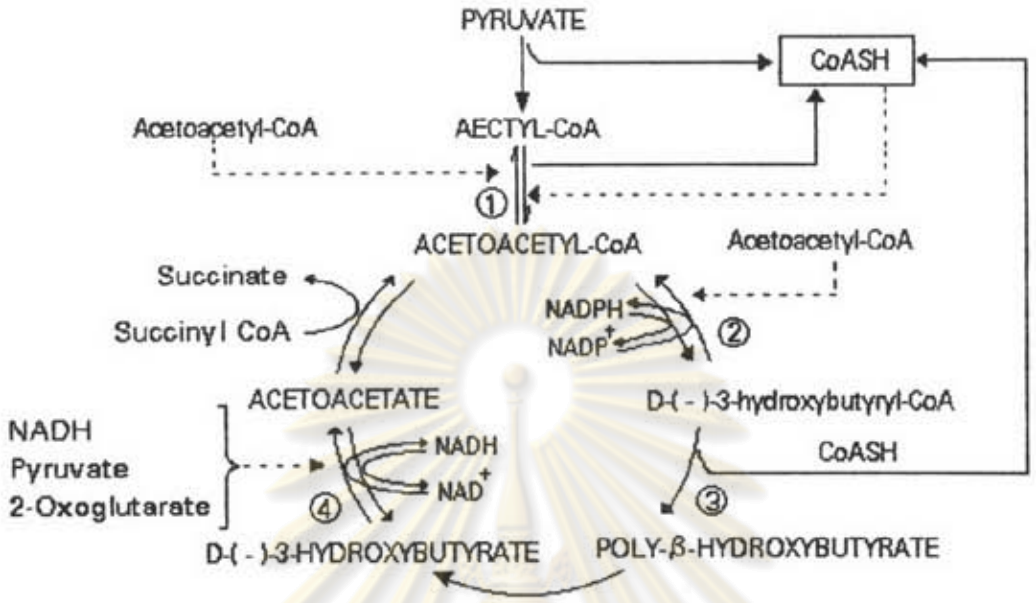
ว่ากระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHB เกิดขึ้นสูง หลังจากการเจริญของจุลินทรีย์ เข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดแล้ว และภายใต้ภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล โดยมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีความจำกัดของปัจจัยบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ (Dawes และ Senior,1973) Heinzle และ Lafferty (1980) พบว่า *A. eutrophus* H16 จะเข้าสู่ระยะการเจริญ (growth phase) และมีการสังเคราะห์โปรตีน เมื่อมีปริมาณแอมโมเนียม (NH_4^+) เพียงพอ ส่วนการสังเคราะห์ PHB จะเพิ่มขึ้นในระยะการสะสม (storage phase) หลังจากที่การสังเคราะห์โปรตีนสิ้นสุดลงและแอมโมเนียมถูกใช้หมด (Sonnleitner และคณะ,1979) Ward และคณะ (1977) พบว่าในภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจนอยู่ระหว่าง 1-3.3 มิลลิลิตรต่อนาที *Azotobacter beijerinckii* สามารถสะสม PHB ได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ Suzuki และคณะ (1986) พบว่าในภาวะของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง หลังจากที่ *Protomonas extorquens* sp.K. เจริญจนมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 160 กรัมต่อลิตร แล้วจำกัดปริมาณไนโตรเจนและแร่ธาตุบางชนิด (minerals) และเติมเมทานอลในอัตรา 0.5 ± 0.2 กรัมต่อลิตร เซลล์สามารถสะสม PHB ได้ 66 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ต่อจากนั้น Suzuki และคณะ (1986) ได้ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีต่อการผลิต PHB ในภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง เริ่มควบคุมอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเมื่อ *Protomonas extorquens* sp.K. เจริญจนมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร พบว่าที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 10 (โมลเมทานอลต่อโมลแอมโมเนีย) เมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไป 121 ชั่วโมง สะสม PHB ได้ 136 กรัมต่อลิตร และเมื่อเวลาผ่านไปถึง 170 ชั่วโมง เซลล์เจริญจนมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 233 กรัมต่อลิตร และสามารถสะสม PHB ได้ 149 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของ PHB จากเมทานอลเท่ากับ 0.2 (กรัม PHB ต่อกรัมเมทานอล) Taidi และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นต่อมวล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โมเลกุลของ PHB โดยเชื้อจุลินทรีย์ *Methylobacterium extorquens* และ *Alcaligenes eutrophus* พบว่าน้ำหนักมวลโมเลกุลเฉลี่ย (weight-average molecular mass; M_w) ของ PHB ที่สร้างโดย *M. extorquens* ขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของเมทานอลและโซเดียมซักซิเนท (Sodium Succinate) ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ค่า M_w สูงสุดเท่ากับ 0.6×10^6 และ 1.7×10^6 ที่ความเข้มข้นเมทานอลและโซเดียมซักซิเนทเท่ากับ 4.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า M_w ของ PHB ที่สร้างจาก *A. eutrophus* มีค่าอยู่ระหว่าง $1.1-1.6*10^6$ และพบว่าชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนไม่มีผลต่อค่า M_w

Oeding และ Schlegel (1973) ตั้งสมมติฐานว่าวิถีการสังเคราะห์ PHB ควรจะเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' or TCA cycle) โดยเริ่มจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ 2 โมเลกุล เปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ และดี-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ (D-(-)-3-hydroxybutyryl-CoA) โดยการทำงานของเอนไซม์บีตา-คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-CoA reductaes) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ของดี-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์พีเอชบีซินทิเตส (PHB synthetase) และ PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส (3-hydroxy butyrate dehydrogenase) (ดังรูปที่ 2.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 วิถีการสังเคราะห์ PHB จากสารตัวกลางของวัฏจักรเครปส์

(1) Acetyl-CoA acyltransferase (2) Acetoacetyl CoA reductase (3) PHB Synthetase (4) 3-hydroxybutyrate dehydrogenase โดยที่เส้นประแสดงถึงสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ (Oeding และ Schlegel,1973 ; Senior และ Dawes,1973)

Senior และ Dawes (1973); Jackson และ Dawes (1976) เสนอว่าในการควบคุมกระบวนการการสังเคราะห์ PHB ของ *Azotobacter beijerinckii* นั้นจุลินทรีย์จะสะสม PHB ภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (oxygen limitation) เนื่องจากภาวะดังกล่าว เอนไซม์ซิเตรทซินเทสและไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ดังนั้นอะซิติลโคเอนไซม์เอจึงไม่สามารถเข้าสู่วัฏจักร TCA แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์บีตา-คีโตไธโอเลส ส่วนภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนปกติ อะซิติลโคเอนไซม์เอจะเข้าสู่วัฏจักร TCA ได้ ระดับความเข้มข้นของอะซิติลโคเอนไซม์เอจึงสูงขึ้น และออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้ง (inhibitor) การทำงานของเอนไซม์บีตา-คีโตไธ

โอเลส ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Oeding และ Schlegel (1973) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดจะไปลดการทำงานของกระบวนการหายใจ (respiration) ในขณะที่ PHB จะทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสารที่มีอานุภาพรีดิวซิง (sink of reducing power) หรือเป็นหน่วยควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox regulator) ภายในเซลล์

Page และ Knosp (1989) รายงานว่า *Azotobacter vinelandII* UWD สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์จากสายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถสังเคราะห์ PHB เพิ่มขึ้นเป็น 65-75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่สามารถสังเคราะห์ PHB ได้เพียง 22-25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โดยที่ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ PHB ของสายพันธุ์ดั้งเดิม จะขึ้นกับภาวะที่มีการจำกัดระดับออกซิเจน ในขณะที่การจำกัดออกซิเจนในสายพันธุ์ UWD จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้กูลโคส เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์บีตา-คีโตไธโอเลส และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสในเซลล์ พบว่าแอคติวิตี้จำเพาะเพิ่มขึ้น 3.6 และ 4.5 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมภายใต้ภาวะเดียวกัน ในขณะที่แอคติวิตี้ของเอนไซม์ซิเตรทซินเทสและเอนเอดีเอชออกซิเดสลดลง 10 และ 16 เท่าตามลำดับ

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าที่ภาวะที่จำกัดออกซิเจน อาจจะไม่ส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB สูงขึ้น เช่นใน *Pseudomonas* sp. (Suzuki และคณะ,1986) Steinbuchel และ Schlegel (1989) พบว่าภายใต้ภาวะที่จำกัดออกซิเจน *A. eutrophus* H16 จะสะสม PHB ได้ในอัตราที่ต่ำกว่าการจำกัดปัจจัยอื่นๆ และปลดปล่อยไพรูเวทออกมา Schlegel และคณะ (1970) พบว่าสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ของ *A. eutrophus* H16 จะมีความบกพร่องในการสังเคราะห์ PHB และจะปลดปล่อยไพรูเวทภายใต้ภาวะที่มีแหล่งคาร์บอน จำพวกแลคเตท กลูโคเนท และฟรุกโตสมากเกินพอ แต่ขาดแอมโมเนียม, โพแทสเซียม, แมกนีเซียม, เหล็ก ซัลเฟต, หรือฟอสเฟต และเมื่อมีการศึกษาโครงสร้างของยีนพบว่า สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์นี้ ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์บีตา-คีโตไธโอเลส, อะซิติลโคเอรีดักเตส และพีเอชบีซินทิเตสได้ (Schubert และคณะ, 1988)

นอกจากนี้ยังขาดกลไกการควบคุมการย่อยสลายเฮกโซส (hexose degradation) อีกด้วย Oeding และ Schlegel (1973) พบว่าในภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (nitrogen limitation) อะซิติลโคเอนไซม์เอจะไม่สามารถเข้าสู่วัฏจักร TCA เพื่อสร้างพลังงานและสังเคราะห์กรดอะมิโน และพบว่าระดับไพรูเวทภายในเซลล์มีค่าสูงกว่าภาวะการเจริญปกติถึง 5 เท่า

Ramsay และคณะ (1989) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas cepacia* แบบไม่ต่อเนื่องภายใต้ภาวะที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน โดยใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในช่วงแรก PHB ยังไม่ถูกสร้างขึ้น จนกระทั่งมีปริมาณไนโตรเจนจำกัด PHB จึงเริ่มถูกสร้างขึ้นและสร้างขึ้นในอัตราคงที่ที่ 0.12 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง โดยมี PHB สะสมถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีค่าอัตราการสร้างเซลล์และอัตราการใช้สารตั้งต้นเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมงและ 0.69 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ตามลำดับ และคิดเป็นผลได้ของเซลล์จากสารอาหารเท่ากับ 0.174 กรัมเซลล์ต่อกรัมฟรุกโตส PHB ที่ได้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 5.37×10^5 กรัมต่อโมล

Kawaguchi และคณะ (1992) ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์และกลไกของการสร้างและการสะสมของ PHB ใน *Alcaligenes eutrophus* โดยแบ่งการเพาะเลี้ยงเป็นแบบหนึ่งขั้นตอนและสองขั้นตอน ในการเลี้ยงแบบหนึ่งขั้นตอน เริ่มจากเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในสารอาหารสูตรเกลือแร่ ที่ประกอบด้วยฟรุกโตส 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราส่วนของโมลคาร์บอนต่อโมลไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 37.7 พบว่าในช่วงแรกเซลล์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งแหล่งไนโตรเจนถูกใช้หมดที่ 19 ชั่วโมง PHB จึงเริ่มถูกสะสมไว้ในเซลล์ และเมื่อผ่านไป 144 ชั่วโมงได้น้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดเท่ากับ 9.2 กรัมต่อลิตร และ PHB 6.9 กรัมต่อลิตร คิดเป็น PHB ที่สะสมในเซลล์สูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหารเท่ากับ 0.345 กรัม PHB ต่อกรัมฟรุกโตส ส่วนในการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอนนั้น *A. eutrophus* ถูกเลี้ยงในอาหารสูตรเกลือแร่ที่

ปราศจากไนโตรเจน พบว่า PHB ถูกสะสมในเซลล์ขณะที่ยังมีแหล่งคาร์บอนอยู่ในภาวะสมดุล อาหารที่ไม่เหมาะสม และอัตราการสะสม PHB จะค่อยๆ ลดลงเมื่อแหล่งคาร์บอนถูกใช้หมด หลังจากนั้น PHB ที่สะสมไว้จะเริ่มถูกนำออกมาใช้ โดยพบว่าอัตราการสะสม PHB มีค่ามากกว่าอัตราการย่อยสลาย PHB เพื่อนำออกไปใช้แทนแหล่งคาร์บอนที่ขาดแคลนถึง 10 เท่า

Kim และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาการผลิต PHB จาก *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 ในการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง ด้วยการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคส ให้มีความเข้มข้นของกลูโคส 10-20 กรัมต่อลิตร ในการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสทำได้ 2 วิธี คือ การใช้อัตราการเกิดกาซคาร์บอนไดออกไซด์จากแมสสเปคโตมิเตอร์ และการใช้เครื่องวิเคราะห์กลูโคสแบบ on-line ในการควบคุมกลูโคสแบบแรก เมื่อความเข้มข้นเซลล์ถึง 30 กรัมต่อลิตร ที่ 25 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง หยุดให้แหล่งไนโตรเจน พบว่า PHB ถูกสร้างและสะสมไว้ในเซลล์ ที่ 47 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเซลล์และ PHB เท่ากับ 93 และ 71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็น PHB ในเซลล์ 76 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเพิ่มเวลาในการหยุดให้แหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อความเข้มข้นเซลล์ถึง 55 กรัมต่อลิตร แล้วหยุดให้แหล่งไนโตรเจน พบว่าที่ 49 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ได้ความเข้มข้นเซลล์และ PHB เท่ากับ 124 และ 92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในการควบคุมกลูโคสแบบที่สองนั้น พยายามควบคุมความเข้มข้นกลูโคสที่ 15 กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นเซลล์ถึง 70 กรัมต่อลิตร แล้วหยุดให้แหล่งไนโตรเจน พบว่าที่ 50 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ได้ความเข้มข้นเซลล์และ PHB เท่ากับ 164 กรัมต่อลิตร และ 121 กรัมต่อลิตรตามลำดับ คิดเป็นอัตราการผลิต PHB 2.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 2.1)

Tanaka และคณะ (1995) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697 โดยใช้กาซคาร์บอนไดออกไซด์ กาซไฮโดรเจน และกาซออกซิเจน พบว่าเมื่อให้กาซออกซิเจนเข้าไปในถังหมักโดยแยกจากกาซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน เซลล์สามารถ

เจริญโดยไม่มีระยะปรับตัว เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป 18 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเซลล์ 28.2 กรัมต่อลิตร และเริ่มมีการสะสม PHB ในเซลล์ และเมื่อถึง 40 ชั่วโมงได้ความเข้มข้นเซลล์และ PHB เท่ากับ 91.3 กรัมต่อลิตร และ 61.9 กรัมต่อลิตรตามลำดับ คิดเป็น PHB ในเซลล์ 67.7 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็นอัตราการผลิต PHB 1.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 2.1)

Lee และคณะ (1993) ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และสะสม PHB ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ของเชื้อ *A. eutrophus* NCIMB 11599 โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร แล้วเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆกัน เพื่อให้ได้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 4.1, 7.1 และ 32.8 พบว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น มีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลง แต่เซลล์สามารถสะสม PHB ได้มากขึ้น พบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 32.8 เซลล์สะสม PHB ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยง 32 ชั่วโมง

Kim และคณะ (1996) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Methylobacterium organnophilum* ภายใต้ภาวะที่มีการควบคุมปริมาณโปแตสเซียม ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน ในการเพาะเลี้ยงโดยควบคุมความเข้มข้นของเมทานอลที่ 2-3 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปแตสเซียมในถังหมัก มีความเข้มข้นต่ำกว่า 25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลกระตุ้นให้เซลล์สะสม PHB หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ 70 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเซลล์และ PHB 250 กรัมต่อลิตร และ 130 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ 1.8-2.0 กรัม PHB ต่อลิตร-ชั่วโมง เซลล์สะสม PHB สูงถึง 52-56 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหารเท่ากับ 0.19 กรัม PHB ต่อกรัมเมทานอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 สรุปการผลิต PHB จากเชื้อจุลินทรีย์ และสารอาหารชนิดต่างๆ (Kim และคณะ,1994,Tanaka และคณะ,1995)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	สารอาหาร	วิธีการเพาะเลี้ยง	เวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ PHB (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์ PHB ที่สะสม (% by cell dry weight)	อัตราผลผลิต PHB (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)
A. eutrophus	$H_2/O_2/CO_2$	แบบไม่ต่อเนื่อง	25	25.0	-	-	-
A. eutrophus	$H_2/O_2/CO_2$	แบบไม่ต่อเนื่อง	40	91.3	61.9	67.8	1.55
Pseudomonas hydrogannovora	$H_2/O_2/CO_2$	แบบไม่ต่อเนื่อง	48	24.0	-	-	-
A. eutrophus H16	$H_2/O_2/CO_2$	แบบไม่ต่อเนื่อง	70	18.0	16.0	88.9	0.23
A. eutrophus	$H_2/O_2/CO_2$	แบบไม่ต่อเนื่อง	60	60.0	36.0	60.0	0.60
Recombinant *E. coli*	glucose+ LB medium	แบบกึ่งต่อเนื่อง	42	117.0	89.0	76.0	2.11
Protomonas extroguens	เมทานอล	แบบกึ่งต่อเนื่อง	121	223.0	136.0	61.0	1.12
Protomonas extroguens	เมทานอล	แบบกึ่งต่อเนื่อง	170	223.0	149.0	64.0	0.88
A. eutrophus	กลูโคส	แบบกึ่งต่อเนื่อง	50	164.0	121	76.0	2.42
A. eutrophus	กลูโคส	แบบกึ่งต่อเนื่อง	47	93.0	71.0	76.0	1.51
A. eutrophus	กลูโคส	แบบกึ่งต่อเนื่อง	49	124.0	92.0	74.0	1.87
A. eutrophus	กลูโคส	แบบกึ่งต่อเนื่อง	40	55.0	10.0	18.0	0.25
Azotobacter vinelandii UWD	5% โมลาส	แบบกึ่งต่อเนื่อง	36	-	22.0	-	1.10
Methylobacterium orgasophilum	เมทานอล	แบบกึ่งต่อเนื่อง	70	250.0	130.0	52.0	1.86

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การเพิ่มอัตราผลผลิตโดยใช้เทคนิคไมโครฟิลเตรชัน

Pierrot และคณะ (1986) ได้ใช้เทคนิคไมโครฟิลเตรชันต่อกับถังหมักแบบต่อเนื่อง ปรับปรุงอัตราการเพิ่มผลผลิตของการหมักอะซิโตน-บิวทานอลจากเชื้อ *Cl. acetobutylicum* พบว่าที่อัตราป้อนสารอาหารต่อปริมาตรถังหมักเท่ากับ 0.5 ต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลจุลินทรีย์เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และอัตราผลผลิตตัวทำละลายเพิ่มขึ้นเท่ากับ 6.5 กรัมต่อลิตร -ชั่วโมง โดยที่ความเข้มข้นตัวทำละลายรวมเป็น 13 กรัมต่อลิตร

Afschar และคณะ (1985) ได้ศึกษาการเพิ่มอัตราผลผลิตตัวทำละลายของการหมักอะซิโตน-บิวทานอลจากเชื้อ *Cl. acetobutylicum* ด้วยการใช้ไมโครฟิลเตรชันที่มีการควบคุมความเข้มข้นของเซล พบว่าที่ความเข้มข้นของเซล 8 กรัมต่อลิตร และที่อัตราการป้อนสารอาหารต่อปริมาตรถังหมัก 0.64 ต่อชั่วโมง ให้ค่าอัตราผลผลิตตัวทำละลาย 5.40 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมมีค่า 12-15 กรัมต่อลิตร

Schlote และ G.Gottschalk (1986) ได้ปรับปรุงอัตราการเพิ่มผลผลิตตัวทำละลาย โดยใช้เทคนิคไมโครฟิลเตรชัน โดยมีเยื่อแผ่นเซลลูโลสอะซิเตดเป็นตัวกรอง ในการเลี้ยงเชื้อ *Cl. acetobutylicum* ภายใต้สภาวะปริมาณฟอสเฟตจำกัดที่ 0.74×10^{-3} โมลาร์ พบว่าอัตราการเพิ่มผลผลิตตัวทำละลายเพิ่มถึง 4.1 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ที่อัตราการป้อนสารอาหารต่อปริมาตรถังหมัก 0.40 ต่อชั่วโมง

Muenduen (1989) ได้ศึกษาผลการใช้เทคนิคไมโครฟิลเตรชันต่อกับถังหมักแบบต่อเนื่อง ในการหมักอะซิโตน-บิวทานอลจากเชื้อ *Cl. acetobutylicum* พบว่าสามารถเพิ่มอัตราผลผลิตของตัวทำละลายได้ 6.06 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 42.4 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการป้อนสารอาหารต่อปริมาตรรวมในการหมัก 0.55 ต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวทำละลายรวม 11.03 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบอัตราผลผลิตของตัวทำละลายที่ได้มากกว่าการหมักแบบไม่ต่อเนื่องถึง 24.5 เท่า

Rogers และคณะ (1980) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจาก *Zymomonas mobilis* ในระบบเวียนเซลล์กลับ โดยใช้เยื่อแผ่นพีวีซี ที่มีขนาดรูพรุน 0.6 ไมครอน พบว่าในระบบเวียนเซลล์กลับนี้สามารถเพิ่มเซลล์ชีวมวลได้ถึง 12 เท่าและเพิ่มอัตราผลผลิตเอทานอลถึง 10 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

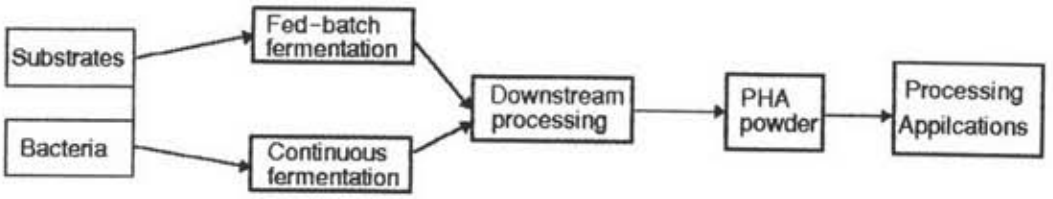
Janssens และคณะ (1983) ได้ใช้ระบบไมโครฟิลเตรชันต่อกับถังหมักแบบต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มอัตราการผลผลิตการหมักเอทานอลจากเชื้อ *Kluyveromyces fragilis* พบว่าที่อัตราการป้อนสารอาหารต่อปริมาตรถังหมักเท่ากับ 0.15 ต่อชั่วโมง ได้เอทานอล 47.3 กรัมต่อลิตร และอัตราผลผลิตเอทานอลสูงสุด 7.1 กรัมเอทานอลต่อลิตร-ชั่วโมง

2.3 <u>การผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต</u> (Production of poly-β-hydroxybutyrate) (Mathlouthi,1992)

2.3.1 การหมัก PHB (PHB fermentations)

ในระยะปี 10 ที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนาการผลิต PHB ในระดับการค้าดังแสดงในรูปที่ 2.3 ในปี 1990 บริษัทอิมพีเรียลเคมีคอลอินดัสทรีส (Imperial Chemical Industries,ICI) เป็นผู้เริ่มต้นผลิตโคพอลิเมอร์ พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-วาเลอเรต (poly-β-hydroxybutyrate-co-valerate) จาก *Alcaligenes eutrophus* ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในลักษณะสองขั้นตอน โดยใช้กลูโคสและกรดโปรปิโอนิคเป็นแหล่งคาร์บอน โดยที่อัตราส่วนของกรดโปรปิโอนิคต่อกลูโคส มีผลต่อปริมาณบีตา-ไฮดรอกซีวาเลอเรตในพอลิเมอร์ ส่วนบริษัท Austrian ได้พัฒนาการผลิต PHB ในระดับ pilot จาก *A. latus* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 แสดงการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและกระบวนการรีโคเวอรี

โดยทั่วไปแล้วประสิทธิภาพของการหมัก สามารถพิจารณาจากปัจจัย 3 ปัจจัยคือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (product yield), อัตราการผลิต (production rate) และความเข้มข้นสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทางบริษัท ICI สามารถพัฒนากระบวนการผลิต จนมีอัตราการผลิต 0.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีค่าประมาณ 75 กรัมต่อลิตร ส่วนทางบริษัท Austrian สามารถผลิต PHB ได้ในอัตรา 1 ตันต่อสัปดาห์ ในถังหมัก 15 ลูกบาศก์เมตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการผลิต PHB 0.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากปัจจัยทั้งสามแล้ว ยังต้องคำนึงถึงต้นทุนของกระบวนการแยกผลผลิตให้บริสุทธิ์ (downstream processing) ซึ่งส่งผลให้ PHB มีราคาสูงขึ้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวสามารถลดต้นทุนการผลิตได้โดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น กากน้ำตาล (molasses) น้ำมันพืชหรือกรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวๆ (long chain fatty acids, LCFAs)

Page (1989) ได้ทำการเลี้ยง *Azobacter vinelandii* UWD โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าต้องใช้กากน้ำตาล 8-10 กิโลกรัมเพื่อผลิต PHB 1 กิโลกรัม ส่วน Akiyama และคณะ (1992) และ Eggink และคณะ (1992) ได้ทำการเลี้ยง *A. eutrophus* ใน LCFAs พบว่าต้องใช้ LCFAs อย่างน้อย 2 กิโลกรัมเพื่อผลิต PHB 1 กิโลกรัม แต่การใช้ LCFAs ในการหมัก จะมีผลกระทบต่อค่าอัตราการถ่ายโอนมวลสาร ระหว่างเฟสของของเหลวสองชนิด (two-liquid phase) และทำให้มีความต้องการออกซิเจนสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจาก

การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในกรดโอลีอิก ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 60 กรัมต่อลิตร และเซลล์มีการสะสม PHB ถึง 65 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 กระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ (Downstream processing) (Griffin, 1994)

ในการแยก PHAs ที่สะสมอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย จำเป็นต้องทำให้ผนังเซลล์แตกก่อน หลังจากนั้นทำการแยกพอลิเมอร์จากซากเซลล์ (cell debris) ซึ่งในระหว่างกระบวนการนี้ต้องระมัดระวังเป็นอย่างมาก เพราะอาจเกิดการย่อยสลายของสายพอลิเมอร์ได้ เพราะฉะนั้นกระบวนการแยก PHAs ออกจากเซลล์ จึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการผลิต PHAs และมีผลต่อความบริสุทธิ์และคุณภาพของพอลิเมอร์ โดยทั่วไปสามารถทำการแยก PHAs ได้ 3 วิธี

2.3.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

PHAs สามารถถูกสกัดจากเซลล์แบคทีเรียด้วยตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น คลอโรฟอร์ม เมทิลลีนคลอไรด์ 1,2-ไดคลอโรเอทเธน 1,1,2-ไตรคลอโรเอทเธน หรือ โพรไพลีนคาร์บอเนท นำสารละลายที่ได้ไปกรองแยกซากเซลล์แบคทีเรียออก หลังจากนั้นทำการตกตะกอนพอลิเมอร์ ด้วยการทำให้สารละลายเย็นตัวลงอย่างช้าๆ หรือเติมเมทานอล เอทานอล ไดเอทิลอีเธอร์ หรือเฮกเซน หากต้องการทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น สามารถทำได้โดยละลายตะกอนพอลิเมอร์ที่ได้ในคลอโรฟอร์ม และตกตะกอนด้วยเฮกเซน หรือไดเอทิลอีเธอร์ซ้ำใหม่อีกครั้ง นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของพอลิเมอร์ได้ โดยทำการล้างเซลล์แบคทีเรีย ด้วยเมทานอล หรืออะซิโตน ก่อนที่สกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ เพื่อที่ล้างไขมันและย่อยสลายโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆออกก่อน ซึ่งพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีนี้จะมีสีขาว และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูง หากแต่ต้องใช้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวทำละลายในการสกัดและตกตะกอน PHAs จำนวนมาก ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์มีราคาแพง ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง ฉะนั้นวิธีการนี้จึงไม่เหมาะสมในระดับอุตสาหกรรม

2.3.2.2 การย่อยด้วยสารเคมี (chemical digestion)

เริ่มจากเซลล์แบคทีเรียถูกบ่มและย่อยด้วยสารเคมี เช่น สารละลายอัลคาไลน์ไฮโปคลอไรท์ เป็นเวลา 30-60 นาที มีผลทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียถูกย่อยสลาย หากแต่พอลิเมอร์ยังคงอยู่ในแกรนูล หลังจากนั้นล้างพอลิเมอร์ด้วยไดเอทิลอีเธอร์ หรือเมทานอล เพื่อล้างไขมันออก อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีก่อให้เกิดผลเสียต่อพอลิเมอร์ คือทำให้ขนาดความยาวของพอลิเมอร์สั้นลง

2.3.2.3 การย่อยด้วยเอนไซม์เฉพาะ (selective enzymatic digestion)

ในวิธีการนี้เซลล์แบคทีเรียจะถูกทำให้แตก ด้วยความร้อน หรือ อัลตราซาวด์ แล้วถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปส และโปรทีเอส หลังจากนั้นเมื่อได้สารแขวนลอยของแกรนูลของ PHA แล้วพอลิเมอร์จะถูกทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer)

2.4 <u>คุณสมบัติของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต</u> (properties of PHB) (Griffin,1994)

PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ 3-hydroxybutyric acid จำนวน 23,000 ถึง 25,000 โมเลกุลมาต่อกัน จุดหลอมเหลวประมาณ 180 องศาเซลเซียสและยังจัดเป็นเทอร์โมพลาสติก โดยมีลักษณะคล้ายเรซิน กล่าวคือมีความหนืดสูงและสามารถหล่อให้เป็นรูปร่างต่างๆ ได้ตามต้องการ ที่อุณหภูมิใกล้เคียงหรือมากกว่าอุณหภูมิจุดหลอมเหลวเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่า PHB มีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเช่น พอลิโพรไพลีน, พอลิเอทธิลีน, และพอลิไวนิล

คลอไรด์ (ตารางที่ 2.2) สามารถนำมาผลิตสารจำพวกพลาสติก ที่สามารถนำไปใช้ในรูปลักษณะของฟิล์ม, เส้นใย, ชีท หรือหล่อให้เป็นรูปร่างต่างๆ ได้ตามต้องการ (Byrom,1987)

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ของ PHB กับพอลิโพรไพลีน

(Polypropylene; pp)

Property	PHB	PP
Crystalline melting point (°C)	175	176
Crystallinity (%)	80	70
Molecular weight (daltons)	$5x10^5$	$2x10^5$
Glass transition temperature (°C)	-4	-10
Density (gcm^{-3})	1.250	0.905
flexural modulus (GPa)	4.0	1.7
Tensile strength (MPa)	40	38
Extension to break (%)	6	400
Ultraviolet resistrance	good	poor
Solvent resistance	poor	good

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย