หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันพลาสติกสังเคราะห์ได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันอย่างมากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อใช้เป็นวัสดุทดแทนแก้วและกระดาษ ผลของการใช้พลาสติกสังเคราะห์ ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่นพอลิโพรไพลีน (polypropylene),พอลิเอทธิลีน(polyethylene) หรือพอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride) จึงก่อให้เกิดปัญหาของการเป็นสารเหลือทิ้งและเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรง เนื่องจากการกำจัดกระทำได้ยากและจุลินทรีย์ในธรรมชาติไม่สามารถย่อยสลายได้ เพื่อขจัดปัญหาดังกล่าวจึงได้เริ่มมีการนำพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ (biodegradable plastic) มาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ (Evan และ Sikdar, 1990)

สารในกลุ่มพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (poly-β-hydroxyalkanoate : PHA) เช่น พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท (poly-β-hydroxybutyrate:PHB) เป็นต้น เป็นกลุ่มสารที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable substance) และมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ (chemical & physical property) ใกล้เคียงกับคุณสมบัติของพลาสติกสังเคราะห์ (ตารางที่ 1) สามารถนำมาใช้ผลิตสารจำพวกพลาสติกที่สามารถนำไปใช้ในรูปลักษณะของฟิล์ม (film), ไฟเบอร์ (fiber), ชีท (sheet) หรือหล่อให้เป็นรูปร่างต่าง ๆ ได้ตามต้องการ (Byrom, 1987)

เนื่องจากการรณรงค์ทางด้านปัญหาสิ่งแวดล้อมกำลังเป็นสิ่งที่จำเป็นในปัจจุบัน รัฐบาลของประเทศที่พัฒนาแล้วบางประเทศ เช่น อิตาลี เดนมาร์ก อเมริกา เป็นต้น ได้ออกกฎหมายห้ามนำพลาสติกที่ย่อยสลายไม่ได้มาใช้ในอุตสาหกรรมการบรรจุหีบห่อสินค้ามากมายหลายประเภท (Evan และ Sikdar, 1990) ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อศึกษาถึงศักยภาพของการนำสารในกลุ่มพอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอทมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์บางชนิด

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของ PHB เทียบกับพอลิโพรไพลีน (Evan และ Sikdar, 1990)

Property	PHB	Polypropylene
Crystalline melting point, °C	175	176
Crystallinity, %	80	70
Molecular weight, daltons	$5x10^5$	$2x10^5$
Glass transition temperature, °C	15	-10
Density, g/cm^3	1.25	0.905
Flexural modulus, GPa	4.0	1.7
Tensile strength, MPa	40	38
Extension to break, %	6	400
UV resistance	Good	Poor
Solvent resistance	Poor	Good

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

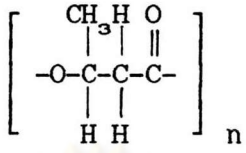
การตรวจเอกสาร

พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท (poly-β-hydroxybutyrate : PHB) เป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) ในสภาพธรรมชาติเป็นสารประเภท aliphatic polyester ซึ่งพบว่ามีการสังเคราะห์และสะสมเป็นลักษณะของแกรนูล (granule) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มากกว่า 20 ชนิด (ตารางที่ 2)

Actinomycetes	Methylobacterium
Alcaligenes	Micrococcus
Azotobacter	Nocardia
Azospirillum	Pseudomonas
Bacillus	Rhizobium
Beijerinckia	Rhodopseudomonas
Chlorogloea	Rhodospirillum
Chromatium	Sphaerotilus
Chromobacterium	Spirillum
Derxia	Streptomyces
Ferrobacillus	Vibrio
Hyphomicrobium	Zoogloea
Lampropaedia	

ตารางที่ 2 แสดงรายชื่อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสาร PHB ในธรรมชาติ (Byrom, 1987)

PHB เป็นพอลิเมอร์ของพอลิแซคคาไรด์ที่มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยโมโนเมอร์ คือ กรดไฮดรอกซีบิวทิริค (3-hydroxybutyric acid) มาต่อกันเป็นสายยาวโดยเฉลี่ย ตั้งแต่ 23,000-25,000 หน่วย (Byrom, 1987) ดังนี้



โดยที่องค์ประกอบภายในแกรนูลจะเป็น PHB ประมาณ 98 เปอร์เซนต์, โปรตีน 2 เปอร์เซนต์ และที่เหลือเป็นไขมันจำพวกกรด phosphatidic และสารประกอบที่ละลายในอะซิโตนปริมาณเล็กน้อย มีจุดหลอมเหลวประมาณ 180 °C น้ำหนักโมเลกุลจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดจุลินทรีย์

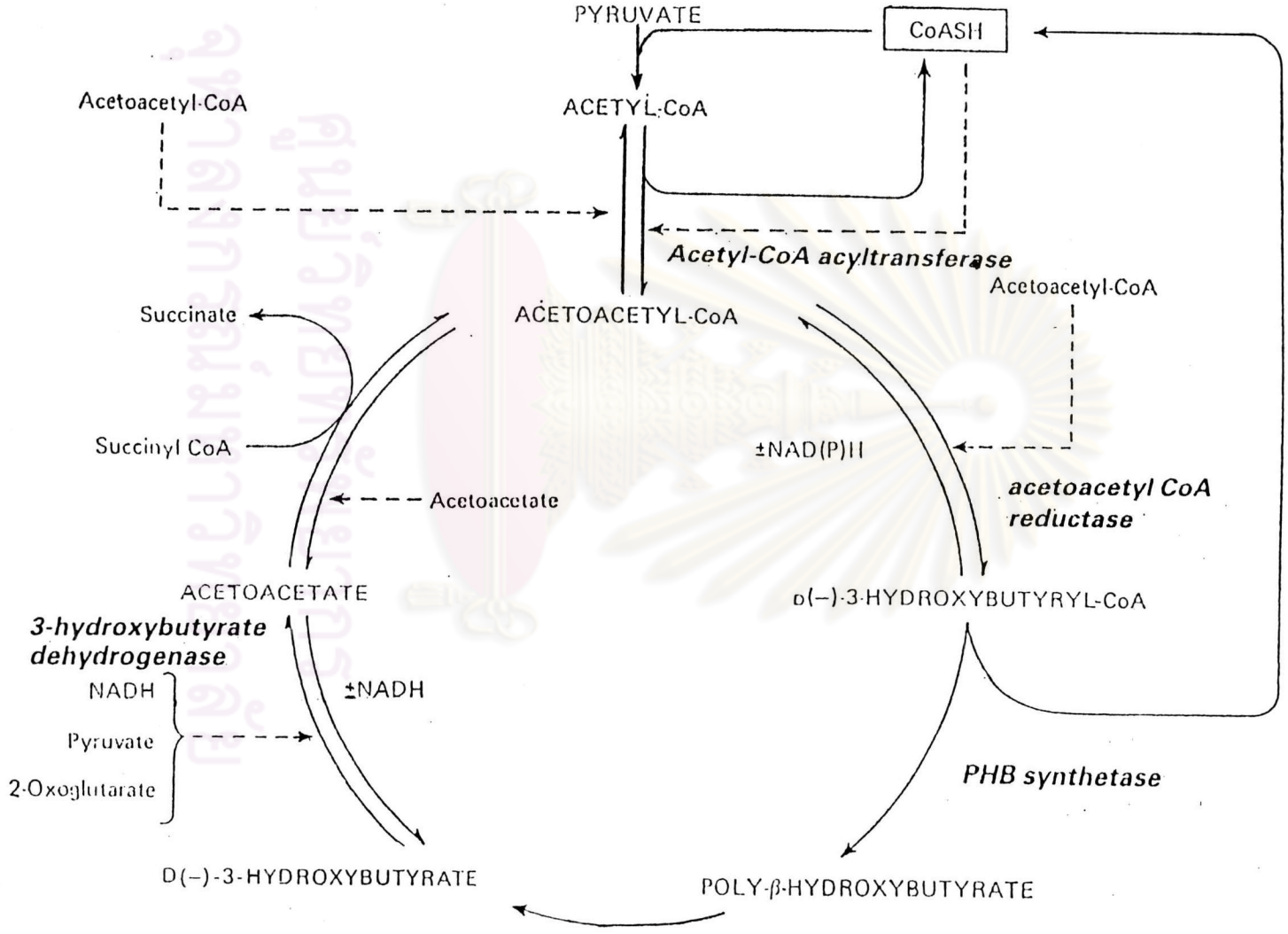
PHB ได้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี 1926 (Lemoigne, 1926) เชื่อกันว่า PHB จะทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนและพลังงาน (Carbon & Energy reserve material) (Holmes, 1985 ; Byrom 1987 ; Dawes และ Senior, 1973) นอกจากนี้ยังอาจทำหน้าที่ควบคุมปริมาณและสัญญาณแคลเซียมภายในเซลล์โดยที่ PHB จะเป็นองค์ประกอบอยู่ในพลาสมาเมมเบรน (plasma membranes) (Reusch, 1989) และเป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการตรึงไนโตรเจนของการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้กลุ่ม *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* กับพืชตระกูลถั่ว โดยการเกิดเมตาบอลิซึมของสารประกอบคาร์บอนซึ่งจะถูกส่งไปที่ปมรากแล้วเข้าสู่วิธี TCA (Karr และคณะ, 1984 ; McDermott และคณะ, 1989)

ในการผลิต PHB ของจุลินทรีย์โดยทั่วไปพบว่ากระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHB จะเกิดขึ้นสูง หลังจากการเจริญของแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดแล้วและภายใต้สภาวะที่สารอาหารไม่สมดุลย์ (nutrient imbalance) กล่าวคือ เมื่อเซลล์จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุลย์ โดยมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอแต่มีความจำกัดของปัจจัยบางชนิดเช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือ ซัลเฟอร์ (Dawes และ Senior, 1973) Heinzle และ Lafferty (1980) รายงานว่า *A.eutrophus* H16 จะเข้าสู่ระยะการเจริญ (growth phase) และมีการสังเคราะห์โปรตีนเมื่อปริมาณแอมโมเนียม (NH_4) เพียงพอ ส่วนการสังเคราะห์ PHB จะเพิ่มขึ้นภายหลังที่การสังเคราะห์โปรตีนสิ้นสุดลงและไม่มีแอมโมเนียมเหลืออยู่เข้าสู่ระยะการสะสม (storage phase) (Sonnleitner และคณะ, 1979) Brivonese และ Sutherland (1989) ศึกษาปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการสะสม PHB ของ *Azotobacter vinelandii* พบว่าในสภาวะของการเพาะเลี้ยงที่มีความจำกัดของออกซิเจนบางส่วน แต่มีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอ แบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้สูงประมาณ 40 เปอร์เซนต์ แต่หากเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับระบบการเพาะเลี้ยงให้มากขึ้น ผลผลิตของ PHB

จะลดลงและการผลิต PHB จะสูงถึง 50 เปอร์เซนต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ขาดไนโตรเจน (nitrogen-free medium) Ward และคณะ (1977) รายงานว่า *Azotobacter beijerinckii* สามารถสะสม PHB ได้ถึง 70 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งในสภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจน ในขณะที่ Suzuki, (1986) พบว่าในสภาวะของการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch หลังจากที่ *Pseudomonas* sp.K เจริญมีปริมาณเซลล์ 160 กรัมต่อลิตร แล้วจำกัดปริมาณไนโตรเจนและแร่ธาตุบางชนิด (minerals) แต่ป้อนเมธานอลในอัตรา 0.5 $\pm$ 0.2 กรัมต่อลิตร เซลล์สามารถสะสม PHB ได้ 66 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วน Mulchandani และคณะ (1989) รายงานว่าอัตราการเจริญของ *A.eutrophus* ATCC 17697 จะขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตกับฟรุกโตส โดยที่อัตราส่วนของปริมาณในช่วงต่ำจะส่งเสริมให้มีการเจริญได้ดีในขณะที่อัตราส่วนของปริมาณในช่วงที่มีค่าสูงจะยับยั้งการเจริญ

Oeding และ Schlegel (1973) ตั้งสมมติฐานว่าวิถีการสังเคราะห์ PHB ควรจะเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยน่าจะเริ่มต้นจากอะซิติลโคเอนไซม์เอเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอและไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ โดยการทำงานของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-CoA reductase) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) ของไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ซินทิเตส (PHB synthetase) และ PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส (3-hydroxybutyrate dehydrogenase) (ดังรูปที่ 1) ในการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ PHB Senior และ Dawes (1973) ; Jackson และ Dawes (1976) เสนอว่า *Azotobacter beijerinckii* จะสะสม PHB ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (oxygen limitation) เนื่องจากสภาวะดังกล่าว เอนไซม์ซิเตรทซินเทสและไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH อะซิติลโคเอนไซม์เอจึงไม่เข้าสู่วัฏจักร TCA แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอเพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส ส่วนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนปกติ อะซิติลโคเอนไซม์เอน่าจะเข้าสู่วัฏจักร TCA ได้ ระดับความเข้มข้นของโคเอนไซม์เอจึงสูงขึ้นและออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้ง (inhibitor) การทำงานของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลสซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Oeding และ Schlegel (1973) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดจะไปลดการทำงานของกระบวนการหายใจ (respiration) ในขณะที่ PHB จะทำหน้าที่เป็นแอ่งเก็บสารมีอานุภาพรีดิวซิ่ง (sink of reducing power) หรือหน่วยควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์(redox regulator)

รูปที่ 1 แสดงสมมุติฐานของวิถีการสังเคราะห์ PHB จากตัวกลางของวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle) (Oeding และ Schlegel, 1973 ; Senior และ Dawes, 1973)

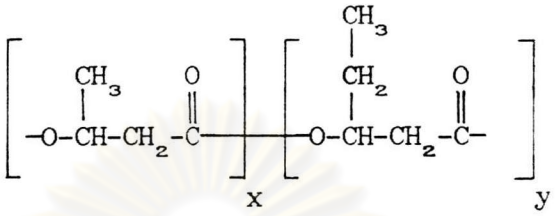

PYRUVATE
CoASH
Acetoacetyl-CoA
ACETYL-CoA
Acetyl-CoA acyltransferase
Acetoacetyl-CoA
Succinate
ACETOACETYL-CoA
Succinyl CoA
±NAD(P)H
Acetoacetate
acetoacetyl CoA reductase
ACETOACETATE
D(−)-3-HYDROXYBUTYRYL-CoA
3-hydroxybutyrate dehydrogenase
NADH
±NADH
Pyruvate
2-Oxoglutarate
PHB synthetase
D(−)-3-HYDROXYBUTYRATE
POLY-β-HYDROXYBUTYRATE

ภายในเซลล์ Page และ Knosp (1989) รายงานว่าจุลินทรีย์ *Azotobacter vinelandii* UWD สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์จากเซลล์ดั้งเดิมสามารถสังเคราะห์ PHB เพิ่มขึ้นเป็น 65-75 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งเมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิมที่สามารถสังเคราะห์ได้เพียง 22-25 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง โดยที่ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ PHB สำหรับสายพันธุ์ดั้งเดิมจะขึ้นกับสภาวะที่มีการจำกัดระดับออกซิเจนในขณะที่การจำกัดระดับออกซิเจนในสายพันธุ์ UWD จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้กลูโคส เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตสในเซลล์ พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 3.6 และ 4.5 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิมภายใต้สภาวะเดียวกัน ในขณะที่เอนไซม์ซิเตรทซินเทสและเอนเอดีเอช ออกซิเดส ลดลง 10 และ 16 เท่าตามลำดับ

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสภาวะที่จำกัดออกซิเจนอาจจะไม่ส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHB สูงขึ้น เช่น ใน *Pseudomonas* sp. (Suzuki และคณะ, 1986) Schlegel และคณะ (1970) พบว่าภายใต้สภาวะที่จำกัดออกซิเจน *A.eutrophus* H16 สะสม PHB ได้ในอัตราที่ต่ำกว่าการจำกัดปัจจัยอื่น ๆ Steinbuchel และ Schlegel (1989) รายงานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่สังเคราะห์ PHB จะปลดปล่อยไพรูเวทภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอน จำพวกแลคเตท กลูโคเนทและฟรุกโตส มากเกินพอแต่ขาดแอมโมเนียม, ซัลเฟต, ฟอสเฟต, โพแทสเซียม, แมกนีเซียมและเหล็ก หลังจากการเจริญสิ้นสุดลง และเมื่อศึกษาโครงสร้างของยีน พบว่า สายพันธุ์ที่ไม่สังเคราะห์ PHB ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และ ซินทิเตสได้ (Schubert และคณะ, 1988) นอกจากนี้ยังขาดกลไกการควบคุมการย่อยสลายเฮกโซส (hexose degradation) อีกด้วย

ในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน (nitrogen limitation) อะซิติลโคเอนไซม์เอจะไม่เข้าสู่วิถี TCA เพื่อสร้างพลังงานและสังเคราะห์กรดอะมิโน (Oeding และ Schlegel, 1973) และพบว่าระดับไพรูเวทภายในเซลล์มีค่าสูงกว่าสภาวะการเจริญปกติถึง 5 เท่า (Oeding และ Schlegel, 1973 อ้างอิงจาก Arhens, 1970)

Holmes (1985) รายงานว่าแบคทีเรียที่สังเคราะห์ PHB ได้สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ในรูปของโคพอลิเมอร์ (copolymer) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิด คือ ไฮดรอกซีบิวทิเรท (3-hydroxybutyrate : 3HB) และไฮดรอกซีวาเลอเรท (3-hydroxyvalerate : 3HV) ดังนี้



3HB 3HV

3HV ในโคพอลิเมอร์จะทำให้คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมบางประการ อาทิเช่น จุดหลอมเหลวและความสามารถในการตกผลึกลดลง ซึ่งมีผลทำให้ความแข็ง (Stiffness : Young's modulus) ลดลงโดยที่ความเหนียว (Toughness : Impact strength) ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าสูงขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่า *A.eutrophus* สามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคสและกรดโปรปิโอนิคเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณของ 3HV ในสายพอลิเมอร์จะขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างกรดโปรปิโอนิคกับกลูโคส ซึ่งจากการทดลองโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ถึง 70 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งจะประกอบด้วย 3HV 33 โมลเปอร์เซนต์และเมื่อใช้กรดโปรปิโอนิคเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ๆ 3HV จะเพิ่มขึ้นเป็น 43 โมลเปอร์เซนต์ (Doi และคณะ, 1986) ต่อมาในปี 1987 Doi และคณะได้รายงานเพิ่มว่า *A.eutrophus* สามารถสร้างโคพอลิเมอร์ที่มีหน่วยของ 3HV 90 โมลเปอร์เซนต์ เมื่อใช้กรดวาเลอริคเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ๆ หรือถ้าใช้ร่วมกับกลูโคสจะได้ 3HV มากกว่าเมื่อใช้กลูโคสร่วมกับกรดโปรปิโอนิค (Haywood และคณะ, 1989)

มีการศึกษาและรายงานว่า *A.eutrophus* สามารถสังเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanote) ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์คือ 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท และ 5-ไฮดรอกซีวาเลอเรท ในรูปของโคพอลิเมอร์และเทอพอลิเมอร์ (terpolymer) ขึ้นกับแหล่งคาร์บอน (Anderson และ Dawes, 1990) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตโดย *A.eutrophus* ATCC 17699 เมื่อเจริญในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน (Anderson และ Dawes, 1990)

Carbon source	Concn (g/liter)	PHA (%wt/wt)	Monomer composition (mol%)				Reference[a]
			3HB	4HB	3HV	5HV	
$CH_3(CH_2)_3COOH$	20	36	10	–[b]	90	–	Doi, Tamaki และคณะ, 1987 (Kunioka, Nakamura และ Doi, 1988)
$Cl(CH_2)_3COOH$	18	27	89	11	–	–	Doi, Nakamura และคณะ, 1988
$HO(CH_2)_3COOH$	16.5	30	67	33	–	–	Doi, Nakamura และคณะ, 1988 (Kunioka, Kawaguchi และDoi, 1989 ; Kunioka, Nakamura และ Doi, 1988)
$HO(CH_2)_3COOH$	9.6	43	82	18	–	–	Kunioka, Nakamura และ Doi, 1988
$CH_3(CH_2)_2COOH$	8						
$HO(CH_2)_4OH$	20	8	75	25	–	–	Kunioka, Kawaguchi และ Doi, 1989 (Doi, Nakamura และคณะ, 1988)
$Cl(CH_2)_4COOH$	15	29	63	37	–	–	Kunioka, Kawaguchi และ Doi, 1989

Carbon source	Concn (g/liter)	PHA (%wt/wt)	Monomer composition (mol%)				Reference[a]
			3HB	4HB	3HV	5HV	
$CH_3(CH_2)_2COOH$	5						
$O(CH_2)_3CO$	20	21	83	17	-	-	Doi, Segawa และKunioka, 1989 (Doi, Segawa และKunioka, 1990 ; Kunioka, Kawaguchi และDoi, 1989)
$O(CH_2)_3CO$	10	65	76	24	-	-	Doi, Segawa และKunioka, 1990
$CH_3(CH_2)_2COOH$	10						
$Cl(CH_2)_4COOH$[c]	20	1	24	-	24	52	Doi, Tamaki และคณะ, 1987
$Cl(CH_2)_4COOH$[c]	5	19	26	-	65	9	Doi, Tamaki และคณะ, 1987
$CH_3(CH_2)_3COOH$	15						
$HO(CH_2)_3COOH$	17.5	18	32	45	23	-	Kunioka, Nakamura และ
$CH_3(CH_2)_3COOH$	2.5						Doi, 1988

[a] Other relevant references in parentheses.

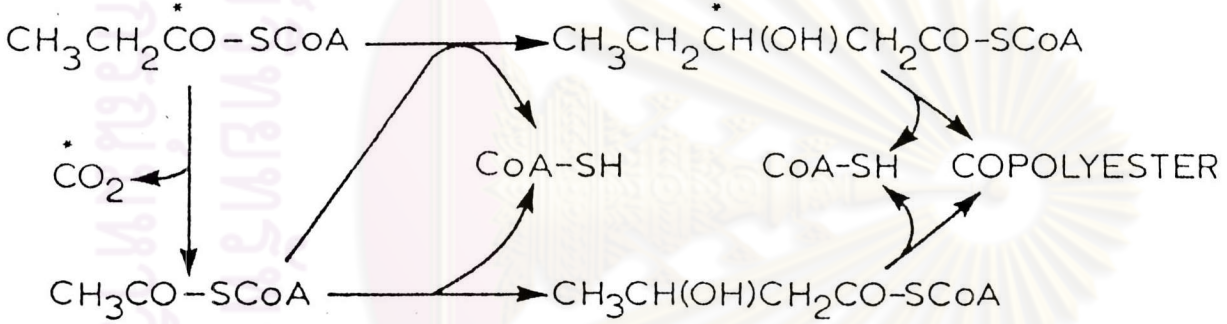
[b] Monomer not reported.

[c] Data for *A.eutrophus* NCIB 11599.

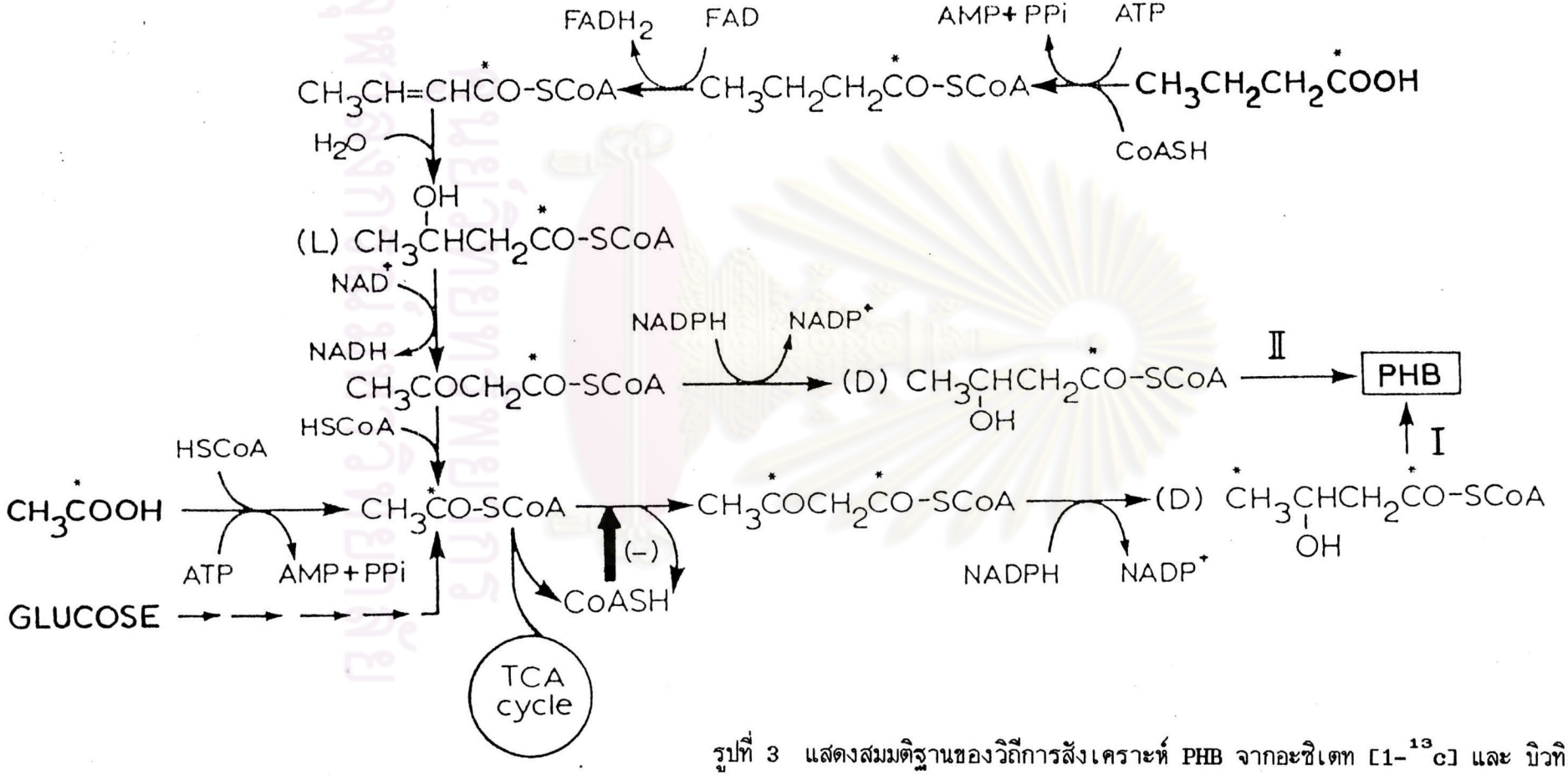
Doi, Nakamura และคณะ (1987) ได้ศึกษาวิถีการสังเคราะห์โคพอลิเอสเทอร์ใน *A.eutrophus* H16 โดยใช้โปรปิโอเนทและอะซิเตทที่ติดสลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีเป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์ผลจาก NMR แล้วเสนอสมมติฐานว่า PHB น่าจะถูกสังเคราะห์จากอะซิเตทตามวิถีในรูปที่ 1 แต่โปรปิโอเนทจะเปลี่ยนไปเป็นโปรปิโอนิลโคเอนไซม์เอแล้วจะปลดปล่อย ^{13}C-labeled carbonyl ได้เป็นอะซิติลโคเอนไซม์เอและดี-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ ตามลำดับ ในขณะเดียวกันโปรปิโอนิลโคเอนไซม์เอบางส่วนจะรวมกับอะซิติลโคเอนไซม์เอได้เป็น ดี-ไฮดรอกซีวาเลอริลโคเอนไซม์เอเพื่อสังเคราะห์เป็นไฮดรอกซีวาเลอเรท (ดังรูปที่ 2) และเมื่อศึกษาในทำนองเดียวกันโดยใช้บิวทิเรทและอะซิเตท Doi, Tamaki และคณะ (1988) พบว่า *A.eutrophus* NCIB 11599 น่าจะสังเคราะห์ PHB ได้ 2 ทางคือ ดี-ไฮดรอกซีบิวทิริล โคเอนไซม์เอสังเคราะห์จากอะซิติลโคเอนไซม์เอผ่านอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ (รูปที่ 1) ส่วนอีกวิถีหนึ่งเชื่อว่าบิวทิเรทสามารถเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอและดี-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอได้โดยตรง (รูปที่ 3) นอกจากนี้ยังรายงานว่าการสร้าง PHB เมื่อใช้กรดบิวทิริคเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ๆ สามารถเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 3-10 กรัมต่อลิตรได้ ในขณะที่ถูกยับยั้งเมื่อใช้กลูโคส เนื่องจากมีการทำงานของวิถีที่ II

Anderson และ Dawes (1990) ได้อ้างอิงการศึกษาใน *Methylosinus trichosporium* OB3b (D.J.Best ; Williams, Ph.D.thesis) ซึ่งใช้มีเธนและเมธานอลเพื่อการเจริญพบว่าวิถีการสังเคราะห์และย่อยสลาย PHB จะขึ้นกับระดับของสารตัวกลาง (intermediate) ในวิถีการสังเคราะห์ PHB และสภาพรีดอกซ์ (redox state) ของเซลล์ แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารตัวกลางในวิถี TCA

งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาถึงการผลิตและกลไกการควบคุมการผลิตพอลิเมอร์โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ เบต้า-คีโตไธโอเลส, อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เชื่อว่าเกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHB และ โคพอลิเมอร์ใน *A.eutrophus* เพื่อความรู้ความเข้าใจและเป็นข้อมูลพื้นฐานของกลไกการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการอันจะนำไปสู่การสนับสนุนการศึกษาหาแนวทางการเพิ่มผลผลิตต่อไป



รูปที่ 2 แสดงสมมติฐานของวิถีการสังเคราะห์ poly (HB-co-HV) จากโปรปิโอเนท [1-^{13}c] ใน *A.eutrophus* (Doi, Nakamura และคณะ, 1987)



รูปที่ 3 แสดงสมมติฐานของวิถีการสังเคราะห์ PHB จากอะซิเตท [1-^{13}c] และ บิวทิเรท [1-^{13}c] ใน *A.eutrophus* (Doi, Tamaki และคณะ, 1988)

<u>โดยมีขั้นตอนของการวิจัยดังนี้</u>

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* และหาสภาวะที่ส่งเสริมให้มีการผลิต PHB สูงขึ้น
2. ศึกษาศักยภาพของการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ใน *A.eutrophus*
3. ศึกษาวิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส , อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส
4. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-คีโตไธโอเลส , อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส และไฮดรอกซิบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนสในสภาวะที่มีการสังเคราะห์ PHB ระดับต่าง ๆ กัน และในสภาวะที่มีการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018824