บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีได้ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะต่อระบบนิเวศน์ เนื่องจาก การที่พลาสติกดังกล่าวไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ หรือย่อยสลายได้ แต่ต้องใช้เวลานาน (Evan และSikdar,1990) ด้วยเหตุที่พลาสติกประกอบด้วยคาร์บอน และไฮโดรเจนเป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้มีความเฉื่อยต่อปฏิกิริยาเคมี การแปรสภาพหรือการทำลายพลาสติกจึงกระทำได้ยาก (Huffman และKeller,1973) วิธีที่ใช้ในการกำจัดขยะพลาสติกในปัจจุบันซึ่งกระทำได้ 3 วิธี ได้แก่ การนำกลับมาใช้ใหม่ (recycling) การฝังดิน และการเผาทำลาย (incineration) (Evan และSikdar,1990) แต่วิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่ไม่สามารถช่วยแก้ปัญหาได้ในระยะยาว การนำกลับมาใช้ใหม่ มีข้อจำกัดในการใช้งานกล่าวคือ พลาสติกที่ใช้แล้วจะมีสิ่งสกปรกตกค้างอยู่ เมื่อได้รับความร้อนอาจปะปนกับอาหารหรือเครื่องดื่มที่บรรจุ และก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้ จึงไม่นิยมนำมาทำผลิตภัณฑ์เพื่อใช้บรรจุอาหารหรือเครื่องดื่มต่างๆ และปัญหาระหว่างกระบวนการผลิต โดยอาจจะเกิดการไหม้ได้ง่ายเนื่องจากเคยผ่านการให้ความร้อนมาแล้วในครั้งแรกของการผลิต หรือ อาจมีปัญหาในการผลิตกล่าวคือ ก้นถุงพลาสติกจะผนึกติดกันยากขึ้น และอายุการใช้งานจะสั้นลง เนื่องจากสมบัติเชิงกลด้อยลง (Leaversuch, 1987) ส่วนการฝังดิน ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้กำจัดขยะส่วนใหญ่ในปัจจุบันเป็นวิธีการกำจัดพลาสติกโดยธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพต่ำ และจะทำให้พื้นที่ที่ฝังไม่เหมาะสมในการทำการเกษตร เนื่องจากพลาสติกใช้ระยะเวลาสลายตัวในดินนานเป็นอุปสรรคต่อการไหลซึมของน้ำ รวมทั้งวิธีนี้ใช้ต้นทุนการดำเนินการสูง เพราะใช้พื้นที่เป็นบริเวณกว้าง ซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหาในการหาพื้นที่รองรับขยะที่มีปริมาณมากขึ้นในอนาคต อีกวิธีหนึ่งคือการเผาทำลายซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ แต่ต้นทุนการลงทุนสูง เพราะต้องใช้อุณหภูมิสูง ถึงแม้ว่าพลังงานที่ได้จากการเผาพลาสติกจะนำไปใช้ใน การผลิตกระแสไฟฟ้า หรือ นำมาเผาอบยาสูบ เป็นต้น ปัญหาที่สำคัญ คือ การที่ไม่สามารถควบคุมควันหรือเขม่าที่เกิดจากการเผาได้ นอกจากนี้การเผาพลาสติกยังมีสารเคมีที่เป็นพิษปล่อยออกมา ซึ่งเป็นการสร้างปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเพิ่มขึ้นอีก (Huffman และKeller,1973) จากปัญหาที่เกิดขึ้น ทำให้ได้มีงานวิจัยที่มุ่งในการคิดค้นเพื่อ

หาวิธีแก้ไขปัญหานี้ โดยการผลิตพลาสติกที่มีลักษณะการสลายตัวของพลาสติก 2 วิถีทาง คือ

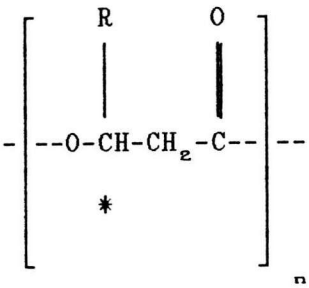
1.พลาสติกที่มีการสลายตัวโดยแสง(photodegradable plastic) พลาสติกชนิดนี้มีกลุ่มคาร์บอนิลเป็นองค์ประกอบที่มีความไวต่อแสง เมื่อสัมผัสกับแสง จะเกิดการแตกตัวของกลุ่มคาร์บอนิล ซึ่งจะทำให้พลาสติกกรอบและแตกเป็นชิ้นเล็กๆ แต่ย่อยสลายไม่ได้สมบูรณ์ เนื่องจากการย่อย ขึ้นอยู่กับ โครงสร้างทางเคมีของพลาสติก ความหนาของชิ้นส่วนพลาสติก และปริมาณของสารประกอบอื่นในพลาสติก ปัจจุบันพลาสติกที่สามารถทำลายโดยวิธีนี้ ได้แก่ พอลีเอทธิลีน(polyethylene)หรือ PE พอลีสไตรีน(polystyrene) หรือ PS พอลีโพรพิลีน (polypropylene)หรือ PP พอลีบิวทีน(polybutene) พอลีบิวทาไดอีน(polybutadiene) พอลีไวนิลคลอไรด์ (polyvinyl chloride) หรือ PVC และ อะซิลโลไนไตรล์-บิวทาไดเอน -สไตรีน (acylonitrile-butadiane-styrene) หรือ ABS ซึ่งได้ผสมสาร photo activator ลงไป (Harper และ Kellar, 1972)

2.พลาสติกที่เติมสารพอลีเมอร์ธรรมชาติซึ่งย่อยสลายได้ โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ได้แก่ เซลลูโลส ลิกนิน ขี้เลื่อย แลกโตส แป้งชนิดต่างๆ เช่น แป้งข้าวโพด (corn starch) และ สารเติมแต่งอื่นๆ (ถ้าเติมแป้งแล้ว จะเรียกว่า thermoplastic starch) เพื่อให้จุลินทรีย์ในดินซึ่งอยู่ในที่ที่มีความชื้น หรือ น้ำ ย่อยสลายอนุภาคสารดังกล่าว ทำให้พลาสติกมีความพรุนมากขึ้น ช่วยในการทำลายร่างแหของแผ่นพลาสติกต่อไป(Evan และSikdar, 1990)

3.พลาสติกที่มีการสลายตัวทางชีวภาพ (biodegrdable plastic)ได้แก่ เทอร์โมพลาสติกชนิดพอลีเอสเตอร์ ซึ่งเป็นพลาสติกที่สลายตัวด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในธรรมชาติไปย่อยหมู่เอสเทอร์ชนิดเอลิฟาติกของพอลีเมอร์ และ ได้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งพลาสติกชนิดนี้จะถูกสร้างและสะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด เป็นกลุ่มสารที่เรียกว่า PHA หรือ พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates) (Brandlและคณะ, 1990)

PHA เป็นกลุ่มพอลีเมอร์ที่จุลินทรีย์หลายชนิดสร้างขึ้น เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่อสิ่งแวดล้อม หรือสภาวะที่ขาดความสมดุลย์ในการเจริญ โดยพบอยู่ในรูปแกรนูล (granule) ภายในเซลล์ (Anderson และคณะ , 1990) แกรนูลของ P(3HB) มีขนาดประมาณ 0.3-1.0 m (Doi, 1990) PHA มีคุณสมบัติของเทอร์โมพลาสติก คือ สามารถนำมาขึ้นรูป และทำให้เป็น ฟิล์ม ชีท ไฟเบอร์ได้ และมีคุณสมบัติ

ใกล้เคียงกับ PP และ PE แต่มีข้อดีกว่าคือ สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติ โดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) และ ดีพอลีเมอเรส (depolymerase) (Brandl และคณะ, 1990 ; Holmes, 1985) จึงมีความน่าสนใจในการนำมาทดแทนการใช้พลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีบางชนิด เช่น PP PE และ PVC ซึ่งในปัจจุบันก่อปัญหาด้านการกำจัดและตกค้างในระบบนิเวศน์เป็นเวลานาน นอกเหนือจากการที่สาร PHA สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ยังสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ใช้สารอาหารราคาถูกได้ และสามารถทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้ชัดเจน ขึ้นอยู่กับ ชนิดของแหล่งคาร์บอน (Byrom, 1987) โครงสร้างของ PHA แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของหน่วยย่อย (monomer) ของ PHA (---) พันธะเอสเทอร์ และ * คือ บีต้า-คาร์บอน (Brandl และคณะ, 1990)

จากรูปที่ 1 เมื่อ R คือหมู่เมทธิล หน่วยย่อย นี้คือ β-hydroxybutyrate หรือ 3HB
เมื่อ R คือหมู่เอทธิล หน่วยย่อย นี้คือ β-hydroxyvalerate หรือ 3HV
เมื่อ R คือหมู่โพรพิล หน่วยย่อย นี้คือ β-hydroxycaproate หรือ 3HC
เมื่อ R คือหมู่บิวทิล หน่วยย่อย นี้คือ β-hydroxyheptanoate หรือ 3HH
เมื่อ R คือหมู่เพนทิล หน่วยย่อย นี้คือ β-hydroxyoctanoate หรือ 3HO
เมื่อ R คือหมู่เฮกซิล หน่วยย่อย นี้คือ β-hydroxynonanoate หรือ 3HN
เมื่อ R คือหมู่เฮปทิล หน่วยย่อย นี้คือ β-hydroxydecanoate หรือ 3HD
เมื่อ R คือหมู่ออกทิล หน่วยย่อย นี้คือ β-hydroxyundecanoate หรือ 3HUD
เมื่อ R คือหมู่โนนิล หน่วยย่อย นี้คือ β-hydroxydodecanoate หรือ 3HDD

PHA มี 2 กลุ่ม ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอน และชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิต กลุ่มแรก คือ PHA ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเพียงชนิดเดียว เรียกว่า โฮโมพอลีเมอร์ (homopolymer) ได้แก่ PHB (poly-ß-hydroxybutyrate) และ PHV (poly-ß-hydroxyvalerate) เป็นต้น (Steinbuchel และคณะ, 1993) ได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนซึ่งมีอะตอมเป็นเลขคู่ เช่น ฟรุกโตส หรือ กลูโลส เป็นต้น กลุ่มที่สองคือ PHA ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยมากกว่า 1 ชนิด เรียกว่า เฮทเทอโรพอลีเมอร์ (heteropolymer) ซึ่งได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนมีอะตอมเป็นเลขคี่ หรือคู่ผสมคี่ แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ โคพอลีเมอร์ (copolymer) ได้แก่ เฮทเทอโรพอลีเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ชนิด เช่น P (3HB-co-3HV) หรือ poly-ß-hydroxybutyrate -co-3-hydroxyvalerate เมื่อใช้กรดวาเลอริก (C5) หรือ กรดโพรพิโอนิก(C3) ร่วมกับกลูโคส(C6) เป็นแหล่งคาร์บอน และ P(3HB-co-4HB) เมื่อใช้กรด-4-ไฮดรอกซีบิวทีริก(C4) ร่วมกับกลูโคส(C6) เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นต้น ประเภทที่สอง ได้แก่ เทอร์พอลีเมอร์ (terpolymer) ซึ่งเป็นเฮทเทอโรพอลีเมอร์ที่ประกอบด้วย หน่วยย่อย 3 ชนิด ได้แก่ P(3HB -4HB-3HV) หรือ poly-ß-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-3-hydroxy valerate เมื่อใช้กรด-4-ไฮดรอกซีบิวทีริก(C4) และกรดวาเลอริก(C5) ร่วมกับกลูโคส(C6) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณองค์ประกอบของหน่วยย่อยแต่ละชนิดที่มี ในเฮทเทอโร พอลีเมอร์สามารถควบคุมได้ ด้วยการให้แหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (Brandl และคณะ, 1990)

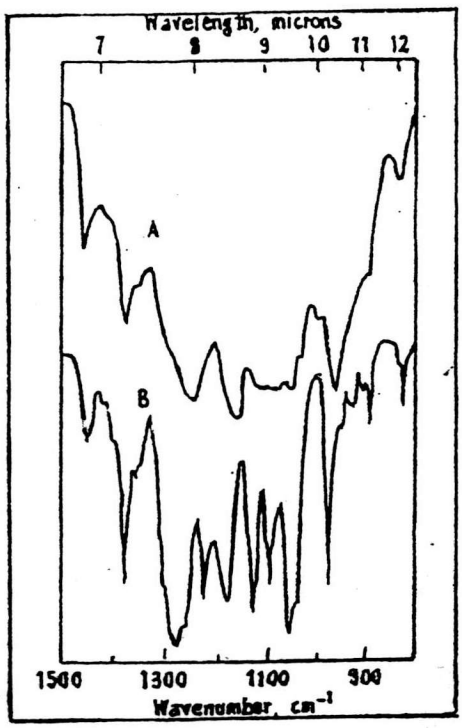
การค้นพบ PHA

มีการพบ PHA ครั้งแรกในปี ค.ศ.1926 โดย Lemoigne (Dawes และ Senior , 1973) ในรูป PHB ซึ่งเป็นโฮโมพอลีเมอร์ที่ประกอบด้วย 3HB เป็นหน่วยย่อย ต่อมา Forsyth และคณะ (1958) พบ PHB ในจุลินทรีย์กลุ่ม *Azotobacter* และกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ Wallen และ Rohwedder(1974)รายงานว่า จุลินทรีย์ที่แยกจากกากตะกอนบำบัดน้ำเสีย (activated sludge) สามารถสร้างและสะสม PHA ที่มี 3HB และ 3HV เป็นหน่วยย่อยหลัก โดยมี 3HV และ 3HH เป็นส่วนน้อย เช่นเดียวกับรายงานของ Findlay และ

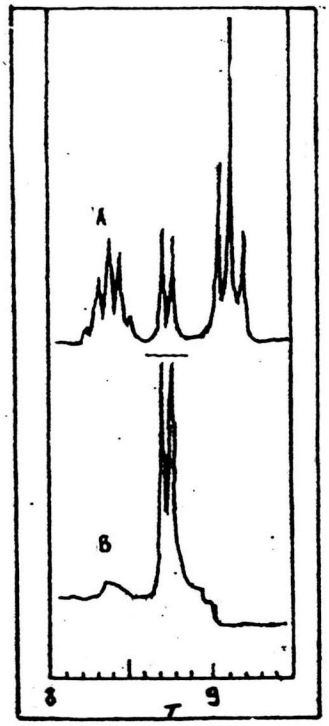
White (1983) ที่พบ PHA ที่มี 3HB และ 3HV เป็นหน่วยย่อยหลัก ในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนจากทะเล (marine sediments) และ พบว่า *Bacillus megaterium* สามารถสร้างเฮทเทอโรพอลีเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย ของ 3HB 3HH และ 3HO ปริมาณ 95 3 และ 2 โมลเปอร์เซนต์ Odham และคณะ(1986)รายงานการพบเฮทเทอโรพอลีเมอร์ที่ประกอบด้วย HB HH และ HO ในกากตะกอนบำบัดน้ำเสีย สมบัติของเฮทเทอโรพอลีเมอร์จะแตกต่างจาก PHB คือ มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า และสามารถละลายได้ในเอทธานอลร้อน ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometry และ NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Spectrophotometry ของ PHB และ เฮทเทอโรพอลีเมอร์ ก็แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 (Wallen และ Roh wedder, 1974)

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพของ เฮทเทอโรพอลีเมอร์ และ PHB (Wallen และ Roh wedder ,1974)

เฮทเทอโรพอลีเมอร์	PHB
ของแข็งสีขาว ละลายในคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนด้วยอีเธอร์ จุดหลอมเหลว 97 ถึง 100 $^{\circ}$ ซ ละลายในเอทธานอลร้อน เป็นฟิลม์เมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก เป็นเฮทเทอร์โรพอลีเมอร์ประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีที่มี คาร์บอน 4 5 และ 6 อะตอม	ของแข็งสีขาว ละลายในคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนด้วยอีเธอร์ จุดหลอมเหลว 160 ถึง 180 $^{\circ}$ ซ ไม่ละลายในเอทธานอลร้อน เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก เป็นโฮโมพอลีเมอร์ประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีที่มีคาร์บอน 4 อะตอม



รูปที่ 2 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometry ของ A คือ เฮ็ทเทอโรพอลีเมอร์ และ B คือ PHB (Wallen และ Rohweller, 1974)



รูปที่ 3 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี NMR spectrometry ของ A คือ เฮ็ทเทอโรพอลีเมอร์ B คือ PHB (Wallen และ Rohweller, 1974)

Haywood และคณะ (1989) ศึกษาถึงความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้แหล่งคาร์บอนเป็น แอลคีน แอลกอฮอลล์ หรือกรดต่าง ๆ ในการผลิต PHA พบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิต PHA ที่มีอะตอมคาร์บอน 4 และ 5 หน่วย ส่วนน้อยจะผลิต PHB และ PHA ที่มีกรด 3-ไฮดรอกซี เป็นองค์ประกอบและมีอะตอมคาร์บอนอยู่ในช่วง 5-10 หน่วย Ramsay และคณะ (1990) ศึกษาจุลินทรีย์ *Alcaligenes latus* *Alcaligenes eutrophus* *Bacillus cereus* *Pseudomonas pseerdoflava* *Pseudomonas cepacia* และ *Micrococcus halodentrificans* ในอาหารที่มีกลูโคส (หรือซูโครสใน *A.latus*) และกรดโพรพิโอนิก พบว่า จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิต PHV ได้ ในปี 1992 Akiyama

และคณะ ได้ศึกษา *Alcaligenes* สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถใช้กรดแอลคาโนอิกที่มีอะตอมคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 22 อะตอม รวมทั้ง สามารถใช้น้ำมันพืช และน้ำมันสัตว์เป็นอาหาร ในการผลิต PHA ภายในเซลล์ Steinbuchel และคณะ (1993) ได้ศึกษา *Chromobacterium violaceum* DSM 30191 ซึ่งผลิต PHV เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิต PHB เมื่อใช้ ฟรุกโตส กลูโคเนต โพรพิโอเนต หรือเฮกซะโนเอต ในปี 1993 Ree และคณะ รายงานถึง ความสามารถในการผลิต PHB ของ *Acinetobacter sp.* ที่แยกจากกากตะกอนบำบัดน้ำเสีย เมื่อเลี้ยงในอาหารที่จำกัดปริมาณซัลเฟต และใช้อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิต PHV เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็น วาเลอเรต Saito และ Doi (1994) ศึกษาการผลิตโคพอลีเมอร์ที่มีกรด 3HB และ 4HB (4-hydroxybutyrate) เป็นหน่วยย่อย โดยเชื้อ *Comamonas acidovorans* DS-1.7 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออล หรือ กรด 4-ไฮดรอกซีบิวทีริก เป็นแหล่งคาร์บอน อัญชนา ศุรติขจร(2537) ศึกษาการผลิต โคพอลีเมอร์ P(3-HB-co-3-HV) โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ กรดอินทรีย์ (กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก และกรดโพรพิโอนิค) เกลือของกรดอินทรีย์ (โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรท และโซเดียมอะซีเตท) น้ำมันพืช (น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันเมล็ดฝ้าย และ น้ำมันเมล็ดทานตะวัน) พอลีไฮดรอกซี (กลีเซอรอล) และ แอลกอฮอล์ (บิวทานอล และเอทธานอล) พบว่าเชื้อจะให้ปริมาณโคพอลีเมอร์สูงสุด (เท่ากับ 47 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถผลิตเทอร์พอลีเมอร์ P(3HB-4HB-3HV) เมื่อใช้กรดวาเลอริก กรดบิวทีริก และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรท เป็นแหล่งคาร์บอนผสม และในปี 1995 Scholz และคณะ รายงานถึง ความสามารถในการผลิตโคพอลีเมอร์ PHN (poly-β-hydroxynonanoate) / PHH (poly-β-hydroxyheptanoate) ซึ่งมี 3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต ปริมาณ 69 เปอร์เซนต์ และ 3-ไฮดรอกซีเฮบตะโนเอต ปริมาณ 25 เปอร์เซนต์ เป็นหน่วยย่อย โดยเชื้อ *Bacillus theringiensis* และ ผลิต PHB เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ตารางที่ 2 แสดงถึง รายงานการพบ PHA ในจุลินทรีย์หลายชนิด (Brandl และคณะ, 1990)

ตารางที่ 2 การสะสมของ PHA ในจุลินทรีย์ต่างๆ (Brandl และคณะ, 1990)

จุลินทรีย์	ปริมาณ PHA สูงสุด (เปอร์เซนต์ ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง)	สารอาหารที่จุลินทรีย์นำมาผลิต PHA
Acinetobacter	<1	กลูโคส
Alcaligenes	96	ฟรุกโตส
Azotobacter	73	กลูโคส
Bacillus	25	กลูโคส
Beijerinckia	38	กลูโคส
Caulobacter	36	กลูโคส/กลูตาเมต
Chromotium	20	อะซีเตต
Chromobacterium	37	กลูโคส/เปปโตน
Clostridium	13	ทริปโตน/เปปโตน/กลูโคส
Halobacterium	38	กลูโคส
Methylobacterium	47	เมทธานอล
Micrococcus	28	เปปโตน/ทริบโตน
Pseudomonas	67	เมทธานอล
Rhizobium	57	แมนนิทอล
Streptomyces	4	กลูโคส

ลักษณะของ PHB

PHB เป็นพอลีเมอร์ที่สร้างและสะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เซลล์เดียวต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรียชนิดแกรมบวก แกรมลบ และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารประเภทคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ โดยสะสมอยู่ภายในแกรนูล (granule) ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2 ถึง 0.5 ไมครอน และมีเมมเบรนซึ่งประกอบด้วย ไขมันและโปรตีนหนา 2 นาโนเมตร มีโครงสร้างเป็นผลึก (crystalline) ซึ่งสะท้อนแสงได้และมีโครงสร้างภายในเป็น fibril ที่ยืดหยุ่นได้ PHB เป็นโฮโมพอลีเมอร์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ กรด 3-ไฮดรอกซีบิวทีริก จำนวน 23,000-25,000 โมเลกุล มีจุดหลอมเหลวประมาณ 180 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลของ PHB จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ วิธีการสกัด ช่วงการเจริญของเซลล์ที่นำมาสกัด และ สภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ ปริมาณสารอาหารที่จำเป็น เป็นต้น (Anderson และคณะ, 1990) PHB เป็นวัสดุที่น่าสนใจในการนำไปใช้งานหลายประเภท เนื่องจาก ความสามารถในการย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ พอลีเมอร์ที่ผลิตได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น PP แต่มีคุณสมบัติทางกายภาพ และ ทางเคมี บางประการที่ดีกว่า เช่น การทนทานต่อ UV ความหนาแน่น จุดหลอมเหลว ระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) เป็นต้น แต่จะทนต่อตัวทำละลายได้น้อยกว่า และเปราะกว่า (Evans และ Sikdar,1990) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สมบัติทางเคมีและกายภาพของ PP และ PHB (Evans และSikdar, 1990)

สมบัติ	PP	PHB
จุดหลอมเหลว ($^{\circ}$ ซ)	171-186	171-182
ความสามารถเป็นผลึก (เปอร์เซนต์) (crystallinity)	65-70	65-80
ความหนาแน่น (g/cm^3)	0.95-0.94	1.23-1.25
น้ำหนักโมเลกุล ($x\ 10^5$)	2.2-7	1-8
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	5-12	2.2-3
ความแข็ง (flexurul modulus)(GPa)	1.7	3.5-4
ความสามารถในการต้านแรงดึง (tensile strength) (MPa)	39	40
ความสามารถในการขยายตัว (extension to break) (เปอร์เซนต์)	400	6-8
ความทนทานต่อแสงอุลตราไวโอเลต (UV resistance)	ไม่ดี ดี	ดี ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน (oxygen permeability) ($cm^{-1}m^{-2}atm^{-1}d^{-1}$)	1700	45

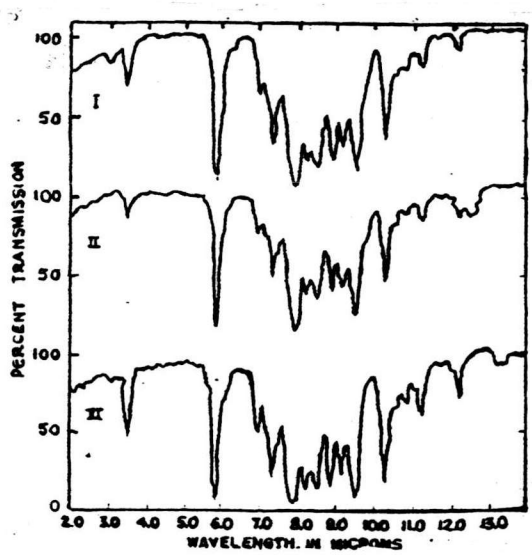
เนื่องจากสมบัติของ PHB ซึ่งมีความเปราะง่าย ในปี 1992 Gatenholm และคณะ รายงานถึง การใช้เซลลูโลสซึ่งเป็นวัสดุธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้ เป็น ฟิลเลอร์ (filler) เติมลงใน PHB เพื่อเพิ่มสมบัติทางเชิงกลของ PHB ให้มีความน่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านที่เหมาะสม โดย PHB ที่เติมเซลลูโลสลงไป จะมีความเป็นเนื้อเดียวกันสูง (degree of homogeneity) และ มีการกระจายตัว (dispersion)ของเซลลูโลสในพอลีเมอร์เมตริกซ์ (polymer matrix) ดีขึ้น

การหาปริมาณและวิเคราะห์ PHA

Williamson และ Wilkinson (1958) รายงานถึง การแยก volutin ที่เป็นสารพอลีฟอสเฟต ซึ่งเป็นแหล่งฟอสเฟต และ PHB ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่จุลินทรีย์สร้างและสะสมขึ้น เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ออกจากกันในเชื้อ *Bacillus megaterium* ด้วยการย้อมสี Sudan Black B Harrington และ Kallo (1960) ศึกษาถึง การพบ PHB ในเซลล์ของ *Pseudomonas methanica* ที่ผ่านการสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม และ สารไฮโปคลอไรต์ โดยการย้อมติดสี Sudan Black B Merrick และ Doudoroff (1961)ยืนยันการพบ PHB จากการย้อมสี Sudan Black B โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสต์ ซึ่งนอกจากสี Sudan Black B แล้ว พบว่า สี Nile Blue A สามารถย้อม PHB ได้เช่นกัน (Ostle และ Holt, 1982) อย่างไรก็ตาม สีทั้งสองเป็นสีย้อมที่ไม่จำเพาะในการทำปฏิกิริยา และจะย้อมได้ไม่เฉพาะ PHB แต่สามารถย้อมแกรนูลไขมันอื่นได้ด้วย การรายงานการตรวจพบ PHB จึงต้องใช้วิธีทางเคมีสนับสนุนด้วย (Ree และคณะ, 1993)

Lemoigne (1926) หาปริมาณ PHB ภายในเซลล์ของเชื้อ *Bacillus megaterium* โดยวิธี Gravimetric method ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยตัวทำละลายอินทรีย์ ที่สามารถละลายเฉพาะ PHB แต่ไม่ละลายไขมันชนิดอื่น ได้แก่ คลอโรฟอร์มต้มเดือดและใช้เมทธานอลหรือเอทธานอล ตกตะกอน PHB กลับคืน นำตะกอนที่อบแห้งไปหาปริมาณ PHB วิธีนี้จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่มีปริมาณ PHB มากในระดับมิลลิกรัม ค่าที่ได้จึงจะถูกต้องและแม่นยำ ต่อมาใช้วิธีทำให้เซลล์แตกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และหาความขุ่นของ PHB ที่อยู่ในแกรนูล แต่ต้องทำกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่ใช้เซลล์ต่างชนิดกัน (Williamson และWilkinson,1958)

ในปี 1961 Law และ Slepecky เสนอวิธีการหาปริมาณ PHB โดยวิธี spectrophotometry โดยการหาค่าการดูดกลืนแสงของกรดโครโตนิก ($C_4H_8O_2$) ซึ่งมีสูตรเคมี ดังนี้คือ CH_3- HC=HCOOH ซึ่งได้มาจากการเปลี่ยน PHB โดยการไฮโดรไลซ์ไปเป็น กรดโครโตนิก ด้วยความร้อน และกรดซัลฟูริกเข้มข้น โดยอ่านที่ค่าความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด วิธีนี้สามารถหาปริมาณ PHB ที่มีปริมาณน้อยได้ คือ 5 ถึง 50 ไมโครกรัม Lundgren และคณะ (1965) วิเคราะห์ PHB ที่สกัดมาจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Infrared Absorption Spectrophotometry พบว่า IR spectrum (Infrared spectrum) ของ PHB ที่สกัดมาจากเชื้อ *Bacillus megaterium* *Pseudomonas saccharophila* และ *Ferrobacillus ferrooxidans* แสดงค่าการดูดกลืนแสงของหมู่คาร์บอนิล หรือ เอสเทอร์เหมือนกันที่ 5.7 μm และ ในเชื้อ *Bacillus megaterium* ซึ่งมีค่า intrinsic viscosity (η) ต่ำ จะให้ค่าการดูดกลืนแสงของหมู่ OH ที่ 2.9 μm ซึ่งตรงกับ ปลายของหมู่เอสเทอร์ (end groups) ของพอลีเมอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4 Wallen และ Rohweller (1974) วิเคราะห์ PHB ที่สกัดจากกากตะกอนที่ได้จากการบำบัดน้ำเสีย ด้วยวิธีเดียวกัน พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของหมู่คาร์บอนิล หรือ หมู่เอสเทอร์ของ PHB อยู่ที่ 1,723 cm^{-1} เปรียบเทียบกับ PHB มาตรฐานที่ใช้ คือ 1,725 cm^{-1}

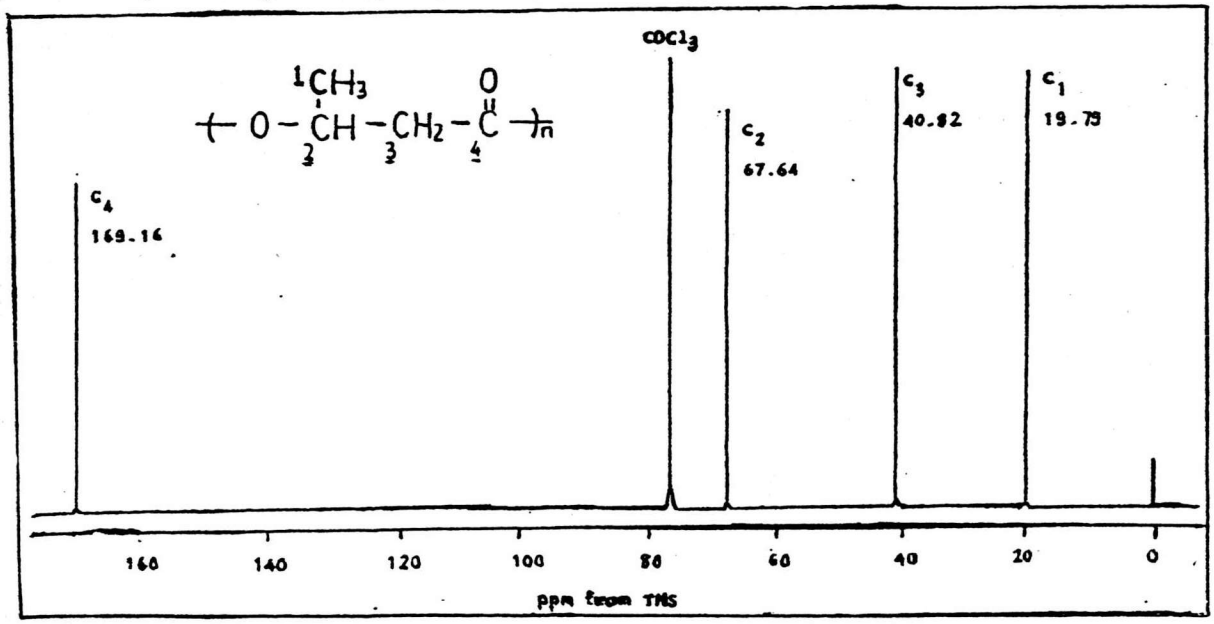


รูปที่ 4 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR (Infrared-absorbtion Spectrum) ของ PHB ที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ต่างๆ คือ (I) *Bacillus megaterium* (II) *Pseudomonas saccharophila* (III)*Ferrobacillus ferrooxidans* (Lundgren และคณะ, 1965)

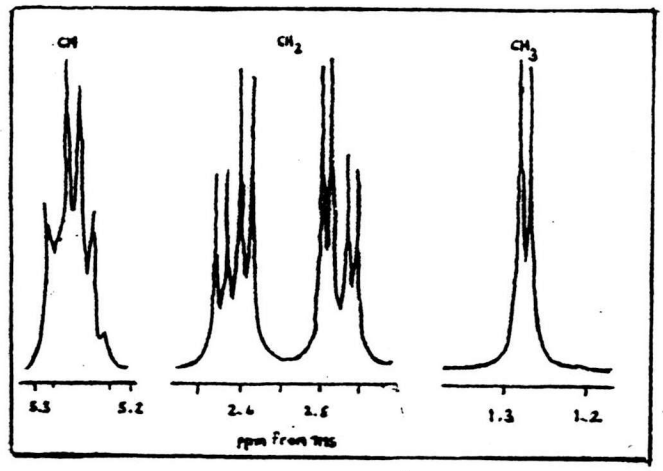
ต่อมาในปี 1978 Braunegg และคณะ รายงานถึง วิธีการหาปริมาณ PHB ในเซลล์ของ *Alcaligenes eutrophus* H16 โดยสามารถหาปริมาณ PHB ที่ต่ำถึง 10^{-5} กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กรด หรือเบส ย่อยสลายได้อนุพันธ์ของเมทธิลเอสเทอร์ของ 3HB ก่อนนำไปหาปริมาณ PHB ด้วยวิธี Gas Chromatography (GC) Findlay และ White (1983) รายงานการวิเคราะห์ PHA จากตะกอนทะเล โดยสามารถหาค่าพอลีเมอร์ที่มีปริมาณต่ำถึง 100 นาโนกรัม ได้จากการใช้วิธี GC ร่วมกับวิธี MS (Mass spectrophotometry) ในปี 1988 Comeau Hall และ Odham ได้เสนอวิธีวิเคราะห์ PHB และ PHV จากตัวอย่างตะกอนบำบัดน้ำเสีย ประกอบด้วย การเตรียมเซลล์ระเหิดแห้งภายใต้สูญญากาศและขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน แล้วเก็บชั้นคลอโรฟอร์มที่มีอนุพันธ์ของ PHA ในรูปเมทธิลเอสเทอร์ของหน่วยย่อยชนิดต่างๆ นำไปวิเคราะห์ด้วย GC โดยใช้ก๊าซตัวพาเป็นฮีเลียม วิเคราะห์ชนิด และปริมาณ PHA เปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน ปริมาณน้อยที่สุดที่วัดได้คือ 10^{-5} กรัมต่อลิตร และเป็นวิธีที่มีขั้นตอนน้อยและง่าย เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ต่อมา Comeau และคณะ (1988) ปรับปรุงการเตรียมเซลล์ระเหิดแห้งภายใต้สูญญากาศ และขั้นตอนการล้างกรดซัลฟุริกและกากเซลล์ในชั้นคลอโรฟอร์มออก เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารที่เคลือบอยู่ในคอลัมน์ การใช้แคปพิลลารีคอลัมน์ช่วยเพิ่มความสามารถในการแยกพีกต่างๆ ออกจากกันได้ดียิ่งขึ้น นอกจากวิธีทางโครโมโตรกราฟีแล้ว วิธี NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Spectrometry เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้บอกถึงชนิดองค์ประกอบ และปริมาณของหน่วยย่อยแต่ละชนิดของ PHA ได้ โดย Doi และคณะ (1986) วิเคราะห์ PHB ที่สกัดแยกได้จาก *Bacillus megaterium* ด้วยวิธี NMR พบว่า ^{13}C และ ^{1}H NMR spectrum มีลักษณะดังรูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ โดย ^{13}C NMR spectrum ของ PHB ประกอบด้วย สัญญาณหลัก (major signal) 4 สัญญาณหลัก คือ หมู่เมทธิล($-CH_3-$)ที่ 19.79 ppm หมู่เมทธิลีน($-CH_2-$)ที่ 40.82 ppm หมู่เมทธีน(-CH-) ที่ 67.64 ppm และ หมู่คาร์บอนิล(-C=O-)ที่ 169.16 ppm สำหรับ ^{1}H NMR spectrum ของ PHB ประกอบด้วย สัญญาณจากโปรตอนของหมู่เมทธิลที่ 1.274 ppm (doublet resonance) หมู่เมทธีนที่ 5.26 ppm(multiplet resonance) หมู่เมทธิลีนที่ 2.45 ถึง 2.65 ppm ซึ่งผลการวิจัยที่ได้เหมือนกับ PHB ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes eutrophus* H 16 แสดงว่า ลักษณะโครงสร้างของ PHB ที่สร้างโดย

แบคทีเรียต่างชนิดกัน อาจมีลักษณะโครงสร้างไม่แตกต่างกันก็ได้ ในปี 1992 Siddiqui และคณะ ศึกษาถึงการพบและปริมาณ PHB ที่พบจากเชื้อ *Trichodesmium thiebautii* โดยวิธี Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของกรดโครโตนิกที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร Degelau และคณะ (1995) วิเคราะห์ PHB ภายในเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* ด้วยวิธีฟลูออโรเมตรี (fluorometry) ซึ่งมี 2 แบบคือ สเปกโตรฟลูออโรเมตรี (spectrofluorometry) และ เลเซอร์โฟลไซโตเมตรี (laser flow cytometry) เปรียบเทียบกับ วิธี GC (Braunegg และคณะ, 1978) พบว่า สามารถหาปริมาณ PHB ได้เร็วกว่า

ในการศึกษาองค์ประกอบธาตุคาร์บอน และไฮโดรเจนที่ประกอบอยู่ใน PHB ด้วยการวิเคราะห์ธาตุ (elemental analysis) พบว่า PHB ที่สกัดได้จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* H16 ประกอบด้วย ธาตุคาร์บอน และธาตุไฮโดรเจน เท่ากับ 55.75 และ 7.28 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับค่าจากการคำนวณจากสูตรเคมีของ PHB $(C_4H_6O_2)_n$ ซึ่งประกอบด้วยธาตุคาร์บอน และธาตุไฮโดรเจนเท่ากับ 55.81 และ 7.03 เปอร์เซนต์ (Dawes และ Senior, 1973)



รูปที่ 5 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดย วิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของสารละลาย PHB ในคลอโรฟอร์ม ที่ 125 MHz 27 °ซ (Doi และคณะ, 1986)



รูปที่ 6 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดย วิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของสารละลาย PHB ในคลอโรฟอร์ม ที่ 500 MHz 27 °ซ (Doi และคณะ, 1986)

การสร้างและสะสม PHB

การสร้างและสะสม PHB ของจุลินทรีย์เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพที่สารอาหารขาดความสมดุลย์โดยมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ และมีการจำกัดสารอาหารบางชนิด ได้แก่ ไนโตรเจน ออกซิเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส หรือ แมกนีเซียม นอกจากความเข้มข้นของสารอาหาร ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อปริมาณพอลีเมอร์ของเซลล์ ได้แก่ อัตราการเจริญซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราการละลายของออกซิเจน และช่วงอายุเชื้อที่เก็บเซลล์ มาวิเคราะห์ ปริมาณพอลีเมอร์ (Haywood, 1958) อายุของเชื้อ สามารถทำให้เกิดการแปรผันของปริมาณไขมันภายในเซลล์มาก โดยเชื้อที่มีอายุมาก (old culture) จะมีอัตราส่วนของเชื้อที่ตายอยู่มาก และเกิดเซลล์ย่อยสลาย (autolysis) ทำให้องค์ประกอบของไขมันเกิดการเปลี่ยนแปลง ยากแก่การตรวจหา PHB (Asselineau, 1966)

Lemoigne และคณะ(1950) รายงานว่าปริมาณ PHB ที่สังเคราะห์ขึ้นจาก *Bacillus megaterium* ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อใช้เชื้อเดียวกัน แต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์ เมื่ออัตราส่วนระหว่างกลูโคสซึ่งเป็นแหล่ง

คาร์บอนและพลังงานต่อแอมโมเนียมคลอไรด์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ปริมาณ PHB ที่สะสมต่อเซลล์จะเพิ่มขึ้น และเมื่อมีการจำกัดไนโตรเจนในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ แต่มีแหล่งคาร์บอนและพลังงานมากเกินพอ ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่าของปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ จากเดิมที่ไม่จำกัดปริมาณไนโตรเจน (Macre และ Wilkinson, 1958)

ในเชื้อ *Bacillus megaterium* KM สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์ พบว่า ไพรูเวต 3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต และกลูโคส จะทำให้ปริมาณ PHB ที่สร้างเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ และเมื่อเติม อะซิเตตร่วมกับสารชนิดใดชนิดหนึ่งในสาร 3 ชนิดดังกล่าว ได้ปริมาณ PHB เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม ดังนั้นอะซีเตต จึงมีความสำคัญต่อกลไกการผลิต PHB ใน *Bacillus megaterium* (Dawes และ Senior, 1973)

นอกจากนี้ พบว่า สารอาหารที่กระตุ้นการสร้างชีสต์ในกลุ่มเชื้อ *Azotobacter* ทำให้การสะสม PHB มากขึ้นด้วย โดย Stevenson และ Socolosky (1966) พบว่า บิวทานอล และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการกระตุ้นการสะสม PHB และชีสต์ ในเชื้อกลุ่มตรึงไนโตรเจน Stockdale และคณะ (1968) พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในอาหาร nitrogen-free medium จาก 1 เป็น 2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น

Repaske และคณะ (1976) รายงานถึงความสำคัญของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน ฟอสเฟต แมกนีเซียม และซัลเฟต ที่กระตุ้นให้เกิดการผลิต PHB ในเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* Wakisaka และคณะ (1982) รายงานถึง ความสำคัญของฟอสเฟต และโพแทสเซียมในการผลิต ซ-endotoxin และ PHB ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดโพแทสเซียม และมีปริมาณฟอสเฟตมากจะเหมาะสมต่อการผลิต PHB ในปี 1995 Scholz และคณะ ได้ศึกษาการผลิต PHB ในเชื้อ *Bacillus thuringenesis* ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการแปรผันปริมาณเกลือฟอสเฟต 2 ชนิดคือ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่า แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาณ 0.43 และ 0.77 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถเพิ่มปริมาณ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จาก 29.2 เป็น 38 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Suzuki และคณะ (1986) พบว่า ปริมาณ PHB ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. K ที่เลี้ยงแบบ batch จะมีปริมาณมากขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

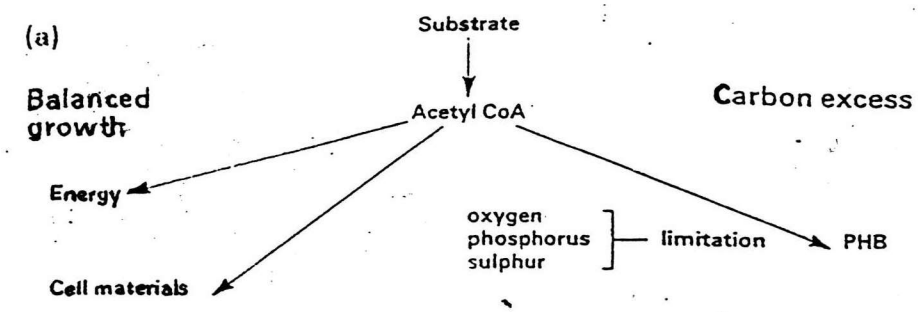
ซึ่งจำกัดสารอาหารจำพวกแอมโมเนียมซัลเฟต แมกนีเซียม เหล็ก และแมงกานีส และการจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะทำให้มีการสะสม PHB ได้มากที่สุด นอกจากนี้ ในเชื้อชนิดเดียวกัน เมื่อศึกษาถึงการเติมเป็นอัตราส่วนของคาร์บอน ต่อ ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหาร ปริมาณ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นด้วย ในปี 1990 Bitar และ Underhill รายงานถึง ผลของแอมโมเนียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิต PHB ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* โดยแอมโมเนียมที่มีปริมาณต่ำจะทำให้เชื้อมีการผลิต PHB เพิ่มขึ้น Daniel และคณะ (1992) รายงานถึง การจำกัดปริมาณแอมโมเนียม แมกนีเซียม และ ฟอตเฟต ในการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* 135 ในอาหารที่มีเมทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยในอาหารที่จำกัดปริมาณแอมโมเนียมซึ่งเลี้ยงแบบ fed-batch จะผลิต PHB ได้สูงสุด เท่ากับ 55 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณ PHB ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยจำกัดปริมาณแมกนีเซียม จะผลิตได้มากกว่าเป็น 2 เท่าของปริมาณ PHB ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยจำกัดปริมาณฟอตเฟต นอกจากนี้พบว่า ในการเลี้ยงเชื้อโดยใช้เกลือแอมโมเนียมในรูปต่างๆ นอกจากรูปแอมโมเนียมซัลเฟต ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต แอมโมเนียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจนจำกัด ทำให้การเจริญของเซลล์ไม่แตกต่างกัน กับ การเจริญเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนจำกัด Page (1992) รายงานถึงความสามารถในการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของธาตุไนโตรเจนที่ซับซ้อน (complex nitrogen) ได้แก่ fish peptone ในการสร้างและสะสม PHB ของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD ซึ่งเลี้ยงแบบ batch culture โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส และ corn syrup ปริมาณ PHB ที่ได้เท่ากับ 75 และ 77 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

ในการศึกษาถึงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆในการผลิต PHB ของจุลินทรีย์นั้น อาจสามารถผลิต PHB ได้จากแหล่งคาร์บอนราคาถูก เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ (Schlegelและคณะ,1961) เอทธานอล (Taylorและ Anthony,1976) หรือ เมทธานอล (Braunegg และคณะ, 1978 Suzuki และคณะ, 1986) Page (1989) รายงานถึงความสามารถในการใช้อาหารที่มีองค์ประกอบของธาตุคาร์บอนที่ซับซ้อน (complex medium) ได้แก่ กากน้ำตาล (molasses) ชนิดต่าง ๆ malt extract และ corn syrup

เป็นแหล่งคาร์บอนในการสะสมและสร้าง PHB ในเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD ที่เลี้ยงแบบ batch culture โดยผลิต PHB ได้มากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวทั้ง 3 ชนิด พบว่า เชื้อผลิต PHB ได้ปริมาณมากที่สุดใน malt extract ได้ปริมาณเท่ากับ 66 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนกากน้ำตาลจากหัวบีท และ corn syrup จะได้ปริมาณ PHB รองลงมา คือเท่ากับ 60 และ 57 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ Linko และคณะ (1993) รายงานถึง การเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* H 16 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ฟรุกโตส ไซโลส กรดฟูมาริก กรดอิทาโคนิก และ กรดโพรพิโอนิก เป็นแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอในการผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า พบว่าปริมาณ PHB สูงสุดที่เชื้อผลิตได้ จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีฟรุกโตสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ เท่ากับ 69 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในปี 1995 Martineztoledo และคณะ รายงานถึง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Azotobacter chroococcum* H23 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอะเพคติน (apectin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำเสียที่ได้จากโรงกลั่นน้ำมันมะกอก (olive oil mills) เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

กลไกการสังเคราะห์และการย่อยสลาย PHB

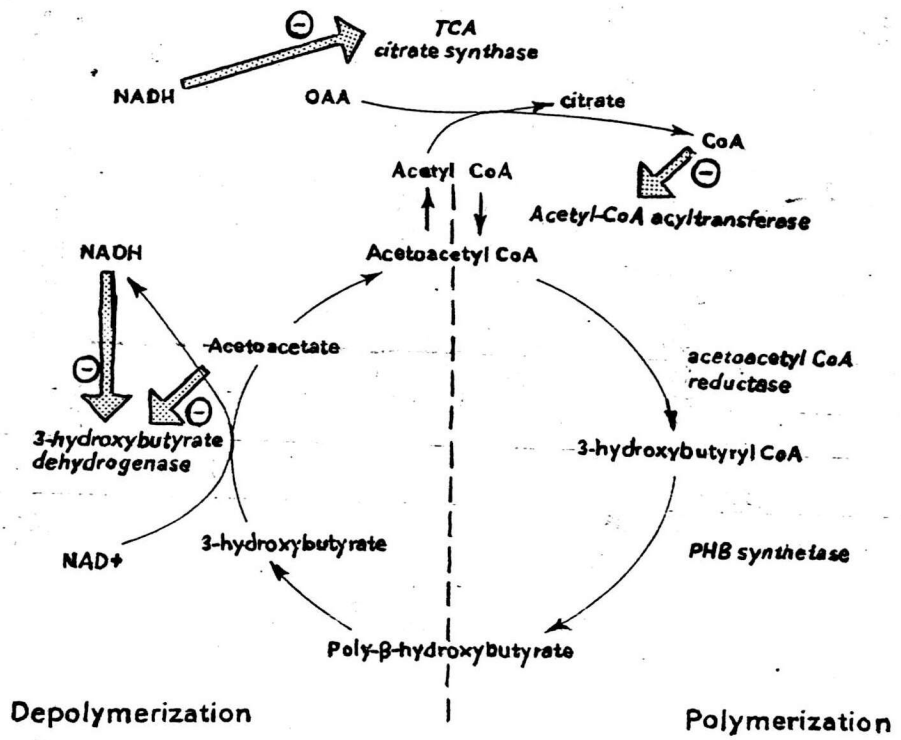
Stanier และคณะ (1959) พบว่า อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) เป็นสารตั้งต้น (precursor)ของการผลิต PHB โดยการศึกษาเชื้อ *Rhodospirillum rubrum* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซิเตต บิวทีเรต และ ดีแอล-3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต ซึ่งรวมตัวเป็น PHB โดยไม่ผ่านการสร้าง ไพรูเวต ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) กระบวนการสร้างและสะสม PHB ของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้น เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะสารอาหารไม่สมดุลย์ (nutrient imbalance) กล่าวคือ สภาวะที่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีสารบางชนิด ได้แก่ ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ อยู่ในปริมาณจำกัด จุลินทรีย์จะสร้างและสะสม PHB ได้ในปริมาณสูง เมื่อการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (Dawes และ Senior, 1973) ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 วิถีการเปลี่ยน Acetyl CoA ไปเป็นสารต่าง ๆ เมื่อเซลล์เติบโตภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารสมดุลย์ (balance growth) และสภาวะที่สารบางอย่างถูกจำกัด แต่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ (carbon excess) (Byrom, 1987)

Oeding และ Schlegel (1973) ตั้งสมมุติฐานวิถีการสังเคราะห์ PHB ถึงความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยน่าจะเริ่มต้นจาก อะซิติลโคเอ เปลี่ยนไปเป็น อะซิโตอะซิลโคเอ (acetoacetyl-CoA) และ ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (hydroxybutyryl-CoA) ตามลำดับ การที่อะซิติลโคเอจะถูกออกซิไดซ์ผ่าน tricarboxylic acid (TCA) cycle หรือเข้ากระบวนการสังเคราะห์ PHB ขึ้นอยู่กับภาวะแวดล้อม เมื่อมีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ และมีการจำกัดปริมาณสารบางอย่าง ซึ่งได้แก่ ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ ซึ่งจะไปยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH ทำให้อัตราส่วนของ NADH ต่อ NAD มีการสะสมเพิ่มขึ้น และส่งผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซิเตรทซินทีเทส (citrate synthetase) ซึ่งเอนไซม์นี้มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่าง ออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) หรือ OAA และ อะซิติลโคเอ ไปเป็น ซิเตรท และให้โคเอนไซม์เอ ออกมา เมื่อเอนไซม์นี้หยุดทำงานปริมาณโคเอนไซม์เอจะลดลง ทำให้เอนไซม์อะซิติล-โคเอ เอซิลทรานเฟอเรส(acetyl-CoA acyl transferase) ซึ่งโดยปกติจะถูกยับยั้งโดยโคเอนไซม์เอ ที่มากเกินพอสามารถทำงาน ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการรวมตัวกันของ อะซิติลโคเอ ไปเป็น อะซิโตอะซิติลโคเอ และ เข้าสู่วงจรการสังเคราะห์ PHB ในที่สุด และ จุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย PHB ให้เป็น CO_2 และพลังงาน

ได้อย่างสมบูรณ์ เช่น ใน *Pseudomonas simplicissimum* ใช้เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ย่อยผิวของ PHB ส่วนผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายจะถูกดูดซึมผ่านผนังเซลล์และถูกเมตาบอไลต์ต่อไป (Holmes, 1985) สำหรับการย่อยสลาย PHB ภายในเซลล์จะอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ 3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต ดีไฮโดรจีเนส (3-hydroxybutyrate dehydrogenase) ดังรูปที่ 8 (Byrom, 1987) เอนไซม์ที่เป็นกลไกสำคัญ (key enzyme) ในการใช้กลูโคส และการสังเคราะห์ PHB ได้แก่ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate dehydrogenase) อะซิติล-โคเอ เอซิลทรานเฟอเรส และ ซิเตรทซินทีเทส ตามลำดับ (Lee และคณะ, 1993)



รูปที่ 8 วงจรการสังเคราะห์ การย่อยสลาย PHB และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Byrom, 1987)

การสร้าง และสะสม PHB มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสปอร์ (sporulation) ในเชื้อกลุ่ม *Bacillus* (Tinelli, 1955)โดย PHB ที่ผลิตและสะสมในช่วงสิ้นสุดการเจริญแบบทวีคูณ จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานในกระบวนการสร้างสปอร์ (Slepecky และLaw, 1961) Juni และ Heym (1956) ศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ *Bacillus cereus* T พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอชสูง จะมีผลยับยั้งการสะสม PHB และเชื้อจะนำ PHB ไปใช้ในการสร้างสปอร์ ทำให้ปริมาณของ PHB ที่สะสมลดลง ส่วนในอาหารที่มีพีเอชต่ำ จะเกิดการยับยั้งการใช้ PHB ระหว่างการผลิตสปอร์ ทำให้มีปริมาณของ PHB เพิ่มขึ้น และก่อนกระบวนการสร้างสปอร์ มีการสร้างและสะสม PHB โดยค่าพีเอชจะลดลงจากเริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 7.4 ลงมาเป็นเท่ากับ 4.0 ถึง 4.9 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการสร้างและสะสม PHB สูงสุด จากนั้นค่าพีเอชจะคงที่ ในขณะที่มีการสร้างสปอร์ Kominek และ Halvorson (1965) ศึกษาพบว่า กรดอะซิติคถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์ PHB ในช่วงแรก และอะซีโตอิน (acetoin) ซึ่งเป็นสารที่ผลิตในระหว่างที่เชื้อเจริญในช่วงพีเอชต่ำจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์ PHB ในช่วงหลัง Nakata (1966) รายงานถึงบทบาทหลักของอะซิเตต และ PHB ในกระบวนการสร้างสปอร์ อะซิเตต และ PHB เป็นสารคาร์บอนเริ่มต้น (carbon precursors) และ แหล่งพลังงานในการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus*

Dawes และ Senior (1973) รายงานว่า การสร้างและสะสม PHB เกี่ยวข้องกับการสร้างซีสต์ (encystment) ในเชื้อกลุ่ม *Azotobacter* โดยการสร้างซีสต์ใน *Azotobacter* นั้น เชื้อจะย่อยสลาย PHB ที่สะสมไว้ และนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

การนำ PHB มาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

บริษัท ICI ประเทศอังกฤษ ได้ผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมโดยผลิตจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* H16 และใช้ชื่อทางการค้าว่า ไบโอโพล (Biopol) โดยมีการนำไปใช้ในงานด้านต่างๆ ได้แก่ ด้านอุตสาหกรรม นำมาใช้ผลิตเป็นภาชนะบรรจุของ เช่น ขวด ถุง ที่ห่อของ ฟิล์ม ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ด้านการแพทย์ อาศัยคุณสมบัติ

ความเข้ากันได้ของ PHB กับ สิ่งมีชีวิต (biocompatability) และสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต โดยนำมาผลิตเป็น เข็มเย็บแผล ไหมเย็บแผล ผ้าซับเลือด ผ้าพันแผล แคปซูลบรรจุยาที่ต้องการให้ตัวยาอยู่ในร่างกายได้นาน ด้านการเกษตร นำมาผลิตเป็นเม็ด (pellet) เพื่อบรรจุสารบางชนิด ได้แก่ ยาฆ่าแมลง ยาฆ่ารา ยาฆ่าวัชพืช และปุ๋ย เพื่อให้สารมีฤทธิ์อยู่ได้นาน โดยค่อย ๆ ปล่อยสารเหล่านี้ออกมา ตามแต่ปริมาณจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้ (Holmes, 1985) ในอนาคตคาดว่าการผลิต PHB เพื่อใช้เป็นสินค้าพลาสติกที่ย่อยสลายได้ จะเป็นวิธีการแก้ปัญหาขยะพลาสติกที่ไม่ย่อยสลายได้ทางหนึ่ง แต่ปัญหาที่สำคัญของการผลิตพอลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจากจุลินทรีย์ คือ ราคาสูง เนื่องจากต้นทุนในการผลิตสูง เมื่อเทียบกับพอลีเมอร์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ค่าใช้จ่ายที่สำคัญในการผลิต คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ และกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ ในปัจจุบันในด้านอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นกับราคาของแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้ โดยคุณภาพของ PHB จะขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในช่วงการสะสม PHB แต่ถ้าสามารถทดแทนแหล่งคาร์บอนราคาแพง เช่น กลูโคส ด้วยวัสดุเหลือทิ้งราคาถูก จะทำให้ราคาของการผลิต PHB ลดลงได้ (Ramsay และคณะ, 1989)

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ได้รายงานถึง การคัดแยก และคัดเลือกเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยสามารถปรับปรุงการผลิต PHB ได้เท่ากับ 46.98 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ชนัญ ผลประไพ (2537) ศึกษาถึง การเพิ่มปริมาณการผลิต PHB โดยเชื้อเดียวกันนี้ ในระดับถังหมัก พบว่า เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณได้ถึง 82.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ เมื่อใช้กากน้ำตาลปริมาณ 20 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูก มาผลิต PHB แทนการใช้ฟรุกโตส ซึ่งมีราคาสูงกว่า เชื้อจะผลิต PHB ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า คือเท่ากับ 53.86 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (น้ำหนักต่อปริมาตร)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมาย เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถสร้าง และสะสม PHB ได้มากโดยแยกจากแหล่งธรรมชาติ ศึกษาลักษณะ (characterization) ของ PHB ที่สร้างโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือก ศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และ กากน้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกในการผลิต PHB เพื่อใช้แทนแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ซึ่งมีราคาแพง และ ศึกษาภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่