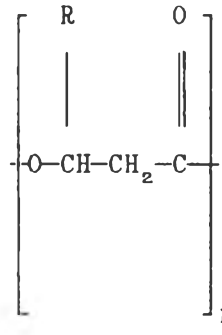
บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันการรักษาสภาวะแวดล้อมมีความสำคัญ และมีการให้ความสนใจกันเป็นอย่างมาก พลาสติกเป็นปัญหากับสิ่งแวดล้อมมาช้านาน เพราะมีการนำมาใช้ทำสิ่งของเครื่องใช้ รวมทั้งภาชนะบรรจุที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่การนำกลับมาใช้ใหม่ หรือการทำลายอย่างถูกวิธีมีขั้นตอนและปัญหาในทางปฏิบัติ พลาสติกที่กล่าวถึงนี้ส่วนใหญ่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก และมีราคาถูก เช่น โพลีโพรไพลีน (polypropylene PP) โพลีเอทธิลีน (polyethylene PE) หรือ โพลีไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride PVC) พลาสติกดังกล่าวล้วนก่อให้เกิดปัญหาด้านการตกค้าง และการกำจัดซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ปัญหาสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันนี้แม้ว่าจะมีการผลิตถุงพลาสติกที่สามารถสลายได้โดยแสงอาทิตย์ หรือรังสีอุลตราไวโอเลต (ultraviolet UV) ก็มิได้ลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้มากนัก เพราะยังมีส่วนของพลาสติกที่ไม่สามารถสลายได้กระจัดกระจาย และตกค้างอยู่ ดังนั้นถ้ามีการทดแทนพลาสติกดังกล่าวด้วยพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ (biodegradable plastic)ก็จะทำให้ลดปัญหาในด้านดังกล่าวนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Evan และ Sikdar,1990) สารโพลีเอสเทอร์บางชนิดที่ผลิตได้และสะสมไว้ในเซลล์จุลินทรีย์ มีสมบัติใกล้เคียงกับสมบัติของพลาสติกในกลุ่ม PP PE และ PVC สารดังกล่าวคือ สารในกลุ่มโพลีเบต้าไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (poly-β-hydroxyalkanoate หรือ PHA) ดังรูปที่1 ตัวอย่างเช่น โพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (poly-β-hydroxybutyrate หรือ PHB) และโพลีเบต้าไฮดรอกซีวาลีเรท (poly-β-hydroxyvalerate หรือ PHV) สารโพลีเมอร์ดังกล่าวมีสมบัติเป็นวัสดุพลาสติกที่ขึ้นรูปและย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable thermoplastic material) โดยเอนไซม์ดีโพลีเมอเรสที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และให้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสภาวะแวดล้อม เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evan และ Sikdar,1990 ; Howells,1982)



รูปที่ 1. สูตรโครงสร้าง PHA (monomer)

จากรูปที่ 1.

เมื่อ R คือหมู่เมทธิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (β-hydroxybutyrate)

เมื่อ R คือหมู่เอทธิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีวารีเรท (β-hydroxyvalerate)

เมื่อ R คือหมู่โพรพิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีคาโพรเอท (β-hydroxycaproate)

เมื่อ R คือหมู่บิวธิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีเฮปตาโนเอท (β-hydroxyheptanoate)

เมื่อ R คือหมู่เพนธิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีออกตาโนเอท (β-hydroxyoctanoate)

เมื่อ R คือหมู่เฮกซิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีโนนาโนเอต (β-hydroxynonanoate)

เมื่อ R คือหมู่เฮปทิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีเดกคาโนเอท (β-hydroxydecanoate)

เมื่อ R คือหมู่ออกทิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีอันเดกคาโนเอท (β-hydroxyundecanoate)

เมื่อ R คือหมู่โนนิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีโดเดกคาโนเอท (β-hydroxydodecanoate)

PHA

PHA เป็นโพลีเมอร์ที่มีหน่วยย่อย (monomer) ในสายโพลีเมอร์เป็นสารจำพวกอัลเคน โดยทั่วไปแบ่ง PHA ได้เป็นสองชนิดคือ ชนิดแรกได้แก่ โฮโมโพลีเมอร์ (homopolymer) หมายถึง โพลีเมอร์ที่มีหน่วยย่อยในสายโพลีเมอร์เพียงชนิดเดียว ตัวอย่างเช่น PHB เป็นต้น ชนิดที่สองได้แก่ เฮทเทอโรโพลีเมอร์ (heteropolymer) คือโพลีเมอร์ที่มีหน่วยย่อยในสายโพลีเมอร์มากกว่าหนึ่งชนิด ตัวอย่างเช่น โคโพลีเมอร์ของ 3HB และ 3HV (P(3HB-co-3HV)) เป็นต้น PHA ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหาร ในสภาวะที่อาหารคาร์บอนของเซลล์มีปริมาณมากเกินพอ

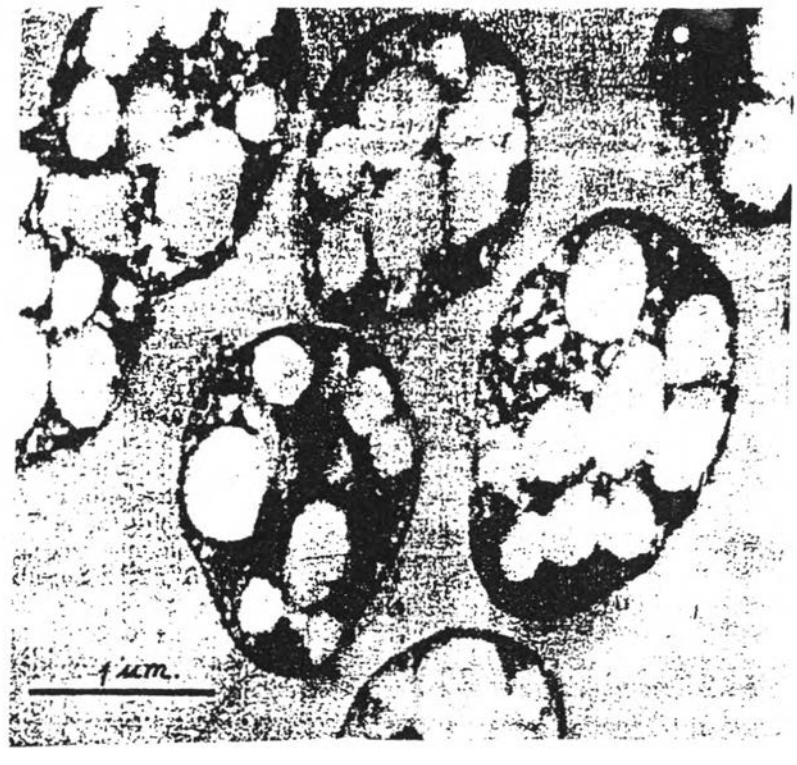
และเกิดการขาดแคลนอาหารสำคัญอย่างใดอย่างหนึ่งพร้อม ๆ กัน (Anderson และ Dawes, 1990)

ลักษณะของ PHB

PHB เป็นโพลีเมอร์ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แบคทีเรียชนิดแกรมบวก แกรมลบ และในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด (ตารางที่ 1) (Byrom,1987) จากการศึกษาพบว่า PHB ทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และพลังงานให้แก่เซลล์เปรียบได้กับไกลโคเจน และแป้ง ที่สะสมในสัตว์ชั้นสูง และพืชตามลำดับ (Bloembergen และคณะ, 1986) PHB จะสะสมอยู่ภายในแกรนูล (granule) ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5 ไมครอน และมีเมมเบรนซึ่งประกอบด้วยไลปิด และโปรตีนหนา 2 นาโนเมตร(รูปที่ 2) ที่ประกอบด้วยไลปิด และโปรตีนซึ่งมีน้ำหนัก 0.5 และ 2.0% ของน้ำหนักแกรนูล จากการศึกษาของ Ballard และคณะ (1987) ซึ่งศึกษาจำนวนและขนาดแกรนูลใน *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนพบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เอื้ออำนวยต่อการสะสม PHB จำนวนแกรนูลต่อเซลล์จะอยู่ในช่วง 8 ถึง 12 แกรนูล และทำให้เซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้นจาก 0.24 เป็น 0.50 ไมครอน มีผลให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนจากยาวรี เป็นค่อนข้างกลม น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยของแกรนูล (วัดโดยวิธี Light-scattering) เท่ากับ $5x10^{9}$ (Ellar และคณะ, 1968) โดยน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเมอร์จะอยู่ในช่วง 10^{3} ถึง 10^{6} ขึ้นกับเชื้อแต่ละชนิด แต่ละแกรนูลประกอบด้วยโพลีเมอร์อย่างน้อย 1,000 สาย Mas และคณะ (1985) พบว่าจากปริมาณและความหนาแน่นที่วัดได้ ทำให้ทราบว่า PHB แกรนูลจาก *A. eutrophus* มีน้ำประมาณ 40% และการผลิต PHB ใน *A. eutrophus* จะหยุดเมื่อปริมาณ PHB ในเซลล์มีประมาณ 80% แม้ว่าเอนไซม์และซับสเตรท ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHB จะยังคงมีอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อที่ภายในเซลล์มีอยู่จำกัด (Ballard และคณะ ,1987)

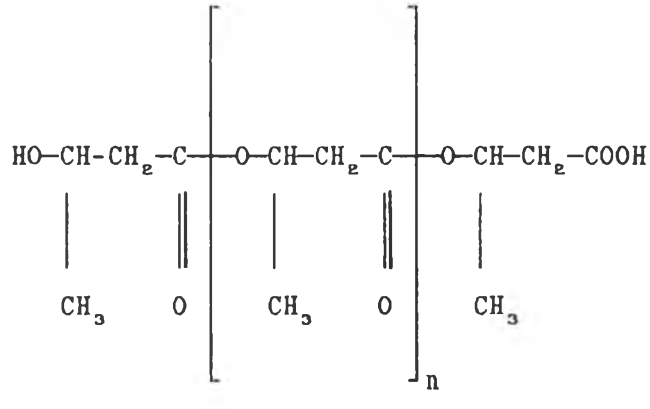
Alcaligenes	*Azotobacter*	*Azospirillum*	*Bacillus*
Bergerinckia	*Chlorogloea*	*Chromatium*	*Chromobacterium*
Derxia	*Hemophilus*	*Hyphomycrobium*	*Lampropaedia*
Methylobacterium	*Micrococcus*	*Nocardia*	*Pseudomonas*
Rhizobium	*Rhodobacter*	*Rhodospirillum*	*Sphaerotilus*
Spirillum	*Actinomyces*	*Vibrio*	*Zoogloea*

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจีนัสของจุลินทรีย์ที่สร้างและสะสม PHB (Byrom, 1987)



รูปที่ 2 ภาพตัดของเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* จากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน แสดง PHB แกรนูลภายในเซลล์ (Byrom, 1987)

PHB จัดเป็นโฮโมโพลีเมอร์ ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ 3-hydroxybutyric acid จำนวน 23,000-25,000 โมเลกุลมาต่อกัน มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 3. (Evan และ Sikdar,1990) จุดหลอมเหลวประมาณ 180 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลของ PHB ในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น *Azotobacter* sp. จะอยู่ในช่วง $8x10^5$ ถึง $2x10^8$ *Alcaligenes eutrophus* จะอยู่ในช่วง $6x10^5$ ถึง $1.2x10^6$ *Pseudomonas* sp. AMI อยู่ในช่วง $5x10^4$ ถึง $6x10^4$ และ *Methylobacterium* sp. B3-Bp อยู่ในช่วง $2.5x10^5$ ถึง $3x10^5$ (Ballard และคณะ,1987) นอกจากชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำให้ PHB มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันแล้ว พบว่าวิธีการสกัด ช่วงการเจริญของเซลล์ที่นำมาสกัด สภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ และปริมาณสารอาหารที่จำเป็นก็มีผลเช่นกัน (Dawes และ Senior, 1973 ; Ballard และคณะ ,1987 ; Berger และคณะ, 1989)



เมื่อ n = 23,000-25,000

รูปที่ 3. สูตรโครงสร้างของ PHB

การค้นพบ PHB

นับตั้งแต่ Lemoigne พบ PHB เป็นครั้งแรกในปี 1926 ซึ่งสกัดแยกได้จาก *Bacillus megaterium* ก็ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ PHB มาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 1926-1974 จนกระทั่งในปี 1974 Wallen และ Rohwedda ได้รายงานถึงเฮทเทอโรโพลีเมอร์ ที่พบในสารสกัดในคลอโรฟอร์มที่แยกได้จากตะกอนบำบัดน้ำเสียพบว่ามี 3HB และ 3HV เป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของ PHB และเฮทเทอโรโพลีเมอร์ที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 2

ในปี 1966 Stevenson และ Socolofsky พบว่าการผลิต PHB และการเข้าสู่ระยะ cyst ของ *Azotobacter* มีความสัมพันธ์กันโดย PHB จะเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน สำหรับกระบวนการ encystment ในปี 1968 Stockdale และคณะพบว่า จุลชีพในตระกูล *Azotobacteriaceae* คือ *Azotobacter, Beijerinckia* และ *Derxia* สามารถผลิต PHB เมื่อให้กลูโคสและแอมโมเนียมไนเตรท เป็นอาหารแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ในปี 1983 Findlay และ White พบว่า *Bacillus megaterium* สามารถสร้างเฮทเทอโรโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยของ 3HB 95% 3HO 2% และ 3HH 3% ในปีเดียวกัน Desmet และคณะพบว่า *Pseudomonas olerovorans* เมื่อเลี้ยงด้วย n-octane จะสะสมแกรนูลเหมือนกับPHB แต่ต่างกันที่สูตรทางเคมี คือ $C_8H_{14}O_2$ ขณะที่ PHB มีสูตร $C_4H_8O_2$ ในปี 1985 Holmes และคณะพบว่า *A. eutrophus* NCIB สามารถสร้างโคโพลีเมอร์ ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ 3HB และ 3HV มาต่อกัน เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กลูโคสและโพรไพโอเนท เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน ในปี 1986 Odham และคณะ ได้พบเฮทเทอโรโพลีเมอร์ ที่ประกอบด้วย HB HH และHO ในตะกอนบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้ยังมีคณะผู้วิจัยอีกหลายกลุ่มที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับ PHB โดยวิธีการหมักที่ใช้จุลินทรีย์ต่างชนิดกัน (Sonnleitner และคณะ, 1979; Emeruwa และ Hawirko, 1973; Schlegel และคณะ, 1961) อย่างไรก็ตาม สิ่งที่พบได้บ่อยในงานวิจัยก็คือ ระดับของ PHB ภายในเซลล์ลดลงอย่างชัดเจน เมื่ออาหารคาร์บอนขาดแคลน หรืออาหารไนโตรเจนมีปริมาณมาก

เกินพอในระยะที่เซลล์กำลังมีการสะสม PHB (Schlegel และคณะ, 1961; Dawes และ Senior, 1973; Senior และ Dawes; 1973) ในปี 1992 Akiyama และคณะ ได้พบ *Alcaligenes* สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถใช้ *n*-alkanoic acid ที่มีอะตอมคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 22 อะตอม รวมทั้งสามารถใช้น้ำมันพืช และน้ำมันสัตว์ เป็นอาหารแหล่งคาร์บอนสำหรับการสะสม PHA ภายในเซลล์

PHA	PHB
ของแข็งสีขาว ละลายในคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนด้วยอีเธอร์ จุดหลอมเหลว 97 ถึง 100°ซ ละลายในเอธานอลร้อน เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก เป็นเฮทเทอโรโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีที่มี คาร์บอน 4 5 และ 6 อะตอม	ของแข็งสีขาว ละลายในคลอโรฟอร์ม ตกตะกอนด้วยอีเธอร์ จุดหลอมเหลว 160 ถึง 180°ซ ละลายในเอธานอลร้อน เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก เป็นโฮโมโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีที่มี คาร์บอน 4 อะตอม

ตารางที่ 2 สมบัติทางกายภาพ และเคมีของ PHA และ PHB

(Wallen และ Rohwedder, 1974)

สมบัติทางกายภาพ และเคมีของ PHB

สาเหตุที่ PHB ได้รับความสนใจ และมีผู้ทำวิจัยเป็นจำนวนมากเนื่องจาก PHB มีสมบัติดีกว่า PP ในด้านของน้ำหนักโมเลกุล จุดหลอมเหลว ระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) และความสามารถในการต้านแรงดึง (tensile strength) แต่มีข้อเสียคือ PHB จะทนต่อตัวทำละลายได้น้อยกว่า แต่จะมีความสามารถในการต้านแสงอุลตราไวโอเลตตามธรรมชาติได้ดีกว่า โดยตามลักษณะทางกายภาพแล้ว PHB จะแข็งกว่าและเปราะกว่า PP (King, 1982; Holmes, 1985; Odham และคณะ, 1986; Bloembergen, 1987) ดังได้แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางเคมี และทางกายภาพระหว่าง PHB และ PP ในตารางที่ 3

อย่างไรก็ตามเมื่อ PHB อยู่ในรูปของโคโพลีเมอร์ (poly(HB-co-HV)) คุณสมบัติบางอย่างจะเปลี่ยนไป กล่าวคือเมื่อมีหน่วยของ 3HV เพิ่มขึ้นจะทำให้ความสามารถในการตกผลึกและจุดหลอมเหลวลดลง ซึ่งจะมีผลทำให้คุณสมบัติทางกายภาพเปลี่ยนไปด้วยเช่น ทำให้ความแข็งลดลงและความเหนียวเพิ่มขึ้น โดยหลักการนี้ทำให้เราสามารถที่จะควบคุมความแข็งและความเปราะของ PHB ให้ลดลงได้โดยเพิ่มปริมาณหน่วยของ 3HV ในสายโพลีเมอร์ก็จะทำให้ได้โพลีเมอร์ที่มีความเหนียวเพิ่มขึ้น ที่ระดับซึ่งความเหนียวและความแข็งสมดุลกัน จะได้โพลีเมอร์ที่มีลักษณะคล้าย PP และเมื่อเพิ่มหน่วยของ 3HV ให้มากขึ้นอีกจะทำให้ได้โพลีเมอร์ที่มีลักษณะอ่อนและเหนียวคล้ายกับ PE และถ้ามีปริมาณ 3HV อยู่น้อยจะได้โพลีเมอร์ที่มีลักษณะแข็งและเปราะคล้ายกับ PVC (Holmes,1985)

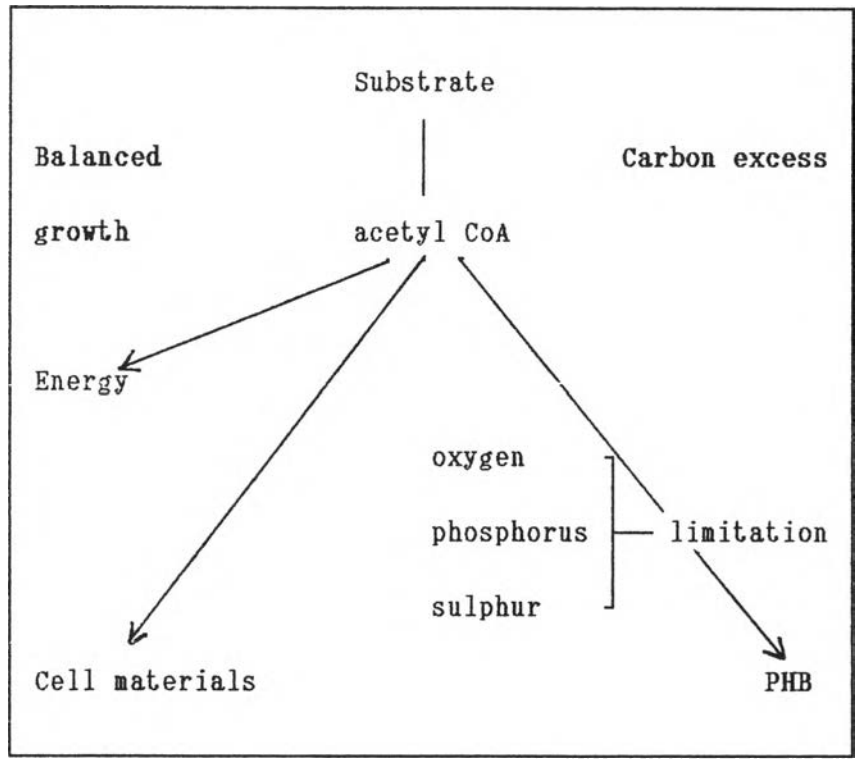
คุณสมบัติ	PP	PHB
จุดหลอมเหลว ($^{\circ}$ซ)	171-186	171-182
ความสามารถเป็นผลึก (%) (crystallinity)	65-70	65-80
ความหนาแน่น (g/cm^3)	0.95-0.94	1.23-1.25
น้ำหนักโมเลกุล ($x10^5$)	2.2-7	1-8
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	5-12	2.2-3
ความแข็ง (GPa) (flexurul modulus)	1.7	3.5-4
ความสามารถในการต้านแรงดึง (MPa) (tensile strength)	39	40
ความสามารถในการขยายตัว(%) (extension to break)	400	6-8
ความทนทานต่อแสงอุลตราไวโอเลต (UV resistance)	ไม่ดี	ดี
ความทนทานต่อตัวทำละลาย (solvent resistance)	ดี	ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน ($cm^3\ m^{-2}\ atm^{-1}\ d^{-1}$) (oxygen permeability)	1700	45

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางเคมี และกายภาพของ PP และ PHB

(Evans และ Sikdar, 1990; Brandl และคณะ, 1990)

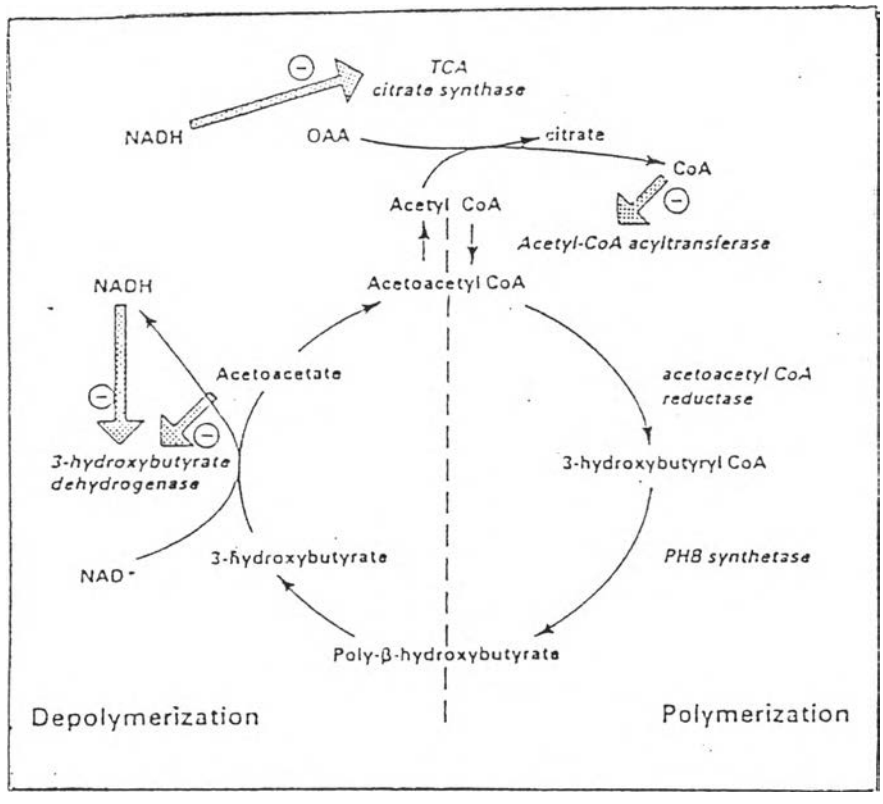
การสังเคราะห์ และการย่อยสลาย PHB

การสร้างและสะสม PHB ของจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับ ความสมดุลย์ของสารอาหารที่อยู่ในสภาวะแวดล้อม กล่าวคือเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพที่สารอาหารขาดความสมดุลย์โดยมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่ก็มีสารบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ในปริมาณจำกัด ในสภาวะเช่นนี้ จุลินทรีย์จะสร้าง และสะสม PHB ในปริมาณมากขึ้น จุลินทรีย์บางชนิดอาจสร้าง PHB ได้สูงถึง 90% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 4) (Byrom,1987)



รูปที่ 4 วิถีการเปลี่ยน Acetyl CoA ไปเป็นสารต่าง ๆ เมื่อเซลล์เติบโตภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารสมดุลย์ (balance growth) และสภาวะที่สารบางอย่างถูกจำกัด แต่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ (carbon excess) (Byrom, 1987)

จากการศึกษาการควบคุมการสังเคราะห์ PHB โดยใช้กลูโคสเป็นอาหาร ภายในเซลล์ของ *Azotobacter beijerinckii* ซึ่งการสะสมโพลีเมอร์จะอยู่ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ และลักษณะที่สำคัญที่เป็นกุญแจในการควบคุมการสร้าง PHB ใน *A. beijerinckii* ก็ขึ้นอยู่กับว่า acetyl-CoA จะถูกออกซิไดซ์ผ่าน tricarboxylic acid (TCA) cycle หรือว่าจะเป็นอาหาร (substrate) สำหรับการสังเคราะห์ PHB ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการจำกัดปริมาณออกซิเจน เมื่อ NADH/NAD ratio เพิ่มขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ NADH ถูกยับยั้ง โดยปริมาณสารที่ถูกจำกัด citrate synthase และ isocitrate dehydrogenase ถูกยับยั้งโดย NADH เพราะฉนั้น acetyl-CoA จะไม่ผ่านเข้า TCA cycle ที่อัตราเดิมแต่จะเปลี่ยนไปเป็น acetoacetyl-CoA โดย 3-ketothiolase (เอนไซม์ตัวแรกใน PHB biosynthetic pathway) ซึ่งสามารถถูกยับยั้งได้โดยโคเอนไซม์เอ ภายใต้สภาวะที่กล่าวจะมีการลดปริมาณคาร์บอนที่ผ่านไปยัง TCA cycle แต่เมื่อออกซิเจนเพียงพอ ความเข้มข้นของโคเอนไซม์เอ จะสูงขึ้นเนื่องมาจากการปลดปล่อยโคเอนไซม์เอ ออกมาจาก acetyl-CoA เมื่อเข้าสู่ TCA cycle และ 3-ketothiolase ก็จะถูกยับยั้งทำให้ PHB ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ (Jackson และ Dawes, 1976 ; Senior และ Dawes ,1971 และ 1973) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 วิถีการสังเคราะห์ และการย่อยสลาย PHB (Byrom, 1987)

PHB สามารถเปลี่ยนเป็น CO_2 และพลังงานได้อย่างสมบูรณ์ โดยจุลชีพเช่น แบคทีเรีย รา และสาหร่าย ตัวอย่างเช่น mycelial fungi จะมีการปล่อย extracellular enzyme ลงบนผิวของ PHB ส่วนผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย จะถูกดูดซึมผ่านผนังเซลล์ และถูกเมตาบอไรซ์ สิ่งนี้ทำให้ PHB เป็นที่รู้จักในชื่อของ biodegradable polymer ความจริงแล้วเพียงแค่ถูกไฮโดรไลซ์ และย่อยสลายเป็น soluble monomer ก่อนที่จะถูกดูดซึมผ่านผนังเซลล์ (Holmes ,1985) สำหรับการย่อยสลาย PHB ภายในเซลล์ จะอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ 3-hydroxybutyrate dehydrogenase เอนไซม์นี้จะถูกควบคุมการทำงานโดยปริมาณของ acetoacetate และ NADH ภายในเซลล์ (รูปที่ 5) (Byrom ,1987)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและการสะสม PHB

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและสะสม PHB นั้น เป็นการศึกษาเรื่องของสารอาหารพร้อมกับสภาวะการเลี้ยงเชื้อ ผลกระทบหรือปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อการเติบโตของเชื้อและการผลิต PHB ขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารอาหารที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อม

ในปี 1962 Repaske ได้ศึกษาถึงสารอาหารที่จำเป็น และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *Hydrogenomonas eutropha* โดยใช้ mineral salt medium ที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีการเจริญสูงสุด และมีปริมาณโปรตีนสูงสุด และเมื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจน จะมีผลยับยั้งการเติบโต อุณหภูมิ 30°ซ และ pH 6.8-7.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสม ส่วนการจำกัดปริมาณออกซิเจนทำให้การเจริญลดลง และต่อมา Repaske และคณะ (1976) ได้ศึกษาปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของ *Alcaligenes eutrophus* พบว่าการจำกัดปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสเฟต แมกนีเซียม และซัลเฟต กระตุ้นให้เกิดการผลิต PHB ต่อมาในปี 1971 Nagai และคณะ ได้ศึกษาการจำกัดปริมาณกลูโคส และออกซิเจนในการเลี้ยง *Azotbacter vinelandii* พบว่าการจำกัดปริมาณออกซิเจน ทำให้เชื้อมีการเจริญดีกว่าการจำกัดปริมาณกลูโคส โดยได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 0.2-0.25 มก./มก.กลูโคส และ 0.03-0.18 มก./มก.กลูโคส ตามลำดับ ต่อมา Nagai และ Aiba (1972) ก็ได้ศึกษาจลน์ศาสตร์ของการเติบโตที่มีผลจากการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักในการเลี้ยงเชื้อ *Azotobacter vinelandii* แบบต่อเนื่อง พบว่าเมื่อค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักสูงขึ้น ค่าสัดส่วนของ เซลล์/กลูโคส จะต่ำลง ต่อมา Senior และคณะ (1972) ได้ศึกษาบทบาทของการจำกัดปริมาณออกซิเจนในน้ำหมัก ที่มีผลต่อการผลิต PHB ในการเลี้ยง *Azotobacter beijerinckii* แบบ batch culture และแบบต่อเนื่อง พบว่าในการเลี้ยงแบบ batch culture เมื่อมีการจำกัดอาหารไนโตรเจน โดยอาหารคาร์บอนมีปริมาณมากเกินพอ จะทำให้สามารถสร้าง PHB ได้สูงถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และถ้ามีการจำกัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักด้วยจะยิ่งทำให้การผลิต PHB สูงขึ้นไปอีกสำหรับการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าการจำกัดปริมาณอาหารคาร์บอนจะทำให้ผลิต PHB ได้น้อยโดยไม่เกิน

3 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อจำกัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะผลิต PHB ได้ 17.6-44.8% แต่เมื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะให้ปริมาณ PHB น้อยกว่า 1.5% และเมื่อจำกัดปริมาณออกซิเจนในการเลี้ยงที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนแล้วจะทำให้การผลิต PHB สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในปี 1977 Ward และคณะได้ศึกษาการเลี้ยง *Azotobacter beijerinckii* ซึ่งสามารถใช้กาซไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนได้ โดยจำกัดปริมาณออกซิเจนพบว่าได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น และได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 74% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในปี 1986 Suzuki และคณะพบว่าในการเลี้ยงแบบ batch cultivation *Pseudomonas* sp. K มีการเติบโตและผลิต PHB ได้ดีเมื่อใช้ minimum synthetic medium โดยควบคุมอุณหภูมิและ pH เท่ากับ 30°ซ และ 7.0 ตามลำดับ เมื่อจำกัดสารอาหารจำพวกแอมโมเนียม ซัลเฟต แมกนีเซียม เหล็ก และแมงกานีส โดยเฉพาะอย่างยิ่งการจำกัดปริมาณอาหารไนโตรเจนจะทำให้มีการสะสม PHB ได้ดีที่สุด ในการเลี้ยงแบบ fed-batch cultivation พบว่าเมื่อมีการเติมแอมโมเนียมจนมีความเข้มข้นสูงเกินไป จะทำให้เกิดการสลายของ PHB ที่สะสมภายในเซลล์และมีการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ และยังพบอีกว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักควรจะอยู่ในระดับที่เพียงพอทั้งสำหรับการเติบโตของเซลล์ และการผลิต PHB จากนั้น Suzuki และคณะ (1986a) ศึกษาการเติมอาหารทั้งคาร์บอน และไนโตรเจนอย่างเป็นสัดส่วน พบว่าสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนยิ่งมากเท่าใด ปริมาณของ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งก็มากขึ้นตามไปด้วย Groom และคณะ (1988) ได้พบว่าการจำกัดปริมาณอาหารไนโตรเจน และให้อาหารคาร์บอนมากเกินพอ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักไม่ต่ำกว่า 80% อิ่มตัวของออกซิเจนจะทำให้เกิดการการผลิตและสะสม PHB ได้ดี ต่อมาในปี 1989 Steinbuchel และ Schlegel พบว่าเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์กลายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแหล่งคาร์บอนเป็นแลคเตท กลูโคเนท หรือ ฟรุคโตส แต่จำกัดปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต ฟอสเฟต โปแตสเซียม หรือ แมกนีเซียม อย่างใดอย่างหนึ่งพบว่ามีผลให้เซลล์มีการสะสม PHB เพิ่มขึ้น Brivonese และ Sutherland (1989) พบว่าปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการสะสม PHB ของ *Azotobacter vinelandii* โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที พบว่าจะได้ PHB เท่ากับ 40% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่เมื่อเลี้ยงด้วย

ความเร็ว 280 รอบ/นาที ได้ปริมาณ PHB ต่ำลงคือเท่ากับ 30% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และต่อมาในปี 1989 Mulchandani และคณะ ได้ศึกษาจลน์ศาสตร์ของการยับยั้งการผลิต PHB โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ ใน *A. eutrophus* พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของธาตุไนโตรเจนและคาร์บอน (N/C ratio) ที่สัดส่วนต่ำจะกระตุ้นการเจริญได้ดี และสัดส่วนที่สูงยับยั้งการเติบโต และพบอีกว่า เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมากกว่า 80% อิ่มตัว จะมีการสะสม PHB สูงถึง 60% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง Page (1989) ได้ศึกษาการนำธาตุอาหารคาร์บอนที่มีองค์ประกอบซับซ้อนเช่น กากน้ำตาล (molasses) ชนิดต่าง ๆ และมอลต์สกัด (malt extract) มาใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในการเลี้ยง *Azotobacter vinelandii* UWD แบบ batch culture โดยมีจุดมุ่งหมายในการลดต้นทุนการผลิต พบว่ามอลต์สกัดให้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 66% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยที่กากน้ำตาลจากหัวบีท (beet molasses) จะให้ปริมาณของ PHB รองลงมาคือ 60% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในปี 1990 Bitar และ Underhill พบว่าเมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 60% ของค่าการละลายอิ่มตัว *A. eutrophus* H16 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูง และ พบว่าการเติบโต การสะสม PHB รวมทั้งอัตราการสังเคราะห์ PHB มีค่าสูงเมื่อให้แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ระหว่างขั้นตอนการสังเคราะห์ PHB Ramsay และคณะ (1990)ได้ศึกษาการผลิต PHB และโคโพลีเมอร์ในการเลี้ยงแบบ fed-batch culture ใน *A. eutrophus* พบว่าเมื่อมีการเติมคาร์บอนและ ไนโตรเจนในสัดส่วนที่เหมาะสม เมื่ออาหารคาร์บอน และไนโตรเจนที่มีอยู่เดิมใกล้จะหมด ทำให้การผลิต PHB สูงขึ้น ในปี 1992 Daniel และคณะพบว่าเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas* 135 โดยใช้เมธานอลเป็นอาหารแหล่งคาร์บอน การจำกัดปริมาณแมกนีเซียม ทำให้ %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง สูงสุด (42.5%) เมื่อเปรียบเทียบกับการจำกัดอาหารแอมโมเนียม และ ฟอสเฟต ที่ให้ %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำรองลงมา (37% และ 34.5%) ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงด้วยวิธี fed-batch cultivation โดยจำกัดปริมาณแอมโมเนียมพบว่า *Pseudomonas* 135 สามารถสร้าง PHB ได้สูงขึ้นเป็น 55% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง Page (1992) พบว่าปริมาณ PHB/โปรตีน ของ *Azotobacter vinelandii* UWD มีปริมาณสูงสุดเมื่อใช้กลูโคส และ corn syrup เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เมื่อมี

fish peptone เป็นอาหารแหล่งไนโตรเจน (complex nitrogen source) ในปี 1993 Rees และคณะ พบว่า *Acinetobacter* spp. ที่แยกได้จากกากตะกอนการบำบัดน้ำเสีย (activated sludge) สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด (11.5% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อจำกัดปริมาณอาหารซัลเฟต รองลงมาคือสภาวะที่จำกัดอาหารแอมโมเนีย และฟอสเฟต (7.8 และ 2.0%) ในปี 1994 Taidi และคณะ ได้ศึกษาผลของอาหารคาร์บอน และความเข้มข้นของอาหารคาร์บอน ที่มีผลต่อมวลโมเลกุลของ PHB ที่ผลิตโดย *Methylobacterium extorquens* และ *Alcaligenes eutrophus* พบว่าสำหรับ *Methylobacterium* เมื่อความเข้มข้นของคาร์บอนเริ่มต้นมีปริมาณต่ำ มวลโมเลกุลของ PHB มีค่าสูงซึ่งตรงข้ามกับ *Alcaligenes eutrophus* ที่มวลโมเลกุลของ PHB มีค่าสูงอยู่แล้ว และความเข้มข้นของอาหารคาร์บอนเริ่มต้นที่ต่างกัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงมวลโมเลกุลของ PHB

การนำ PHB มาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ

ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก PHB มีมากมาย ตัวอย่างเช่น ในด้านอุตสาหกรรมมีการนำ PHB มาผลิตเป็นภาชนะบรรจุของเช่น ขวด ถุง ที่ห่อของ นำมาทำเป็นสิ่งของเครื่องใช้เช่น ฟิล์ม ผ้าอ้อม ส่วนทางด้านการแพทย์อาศัยสมบัติความเข้ากันได้ของ PHB กับสิ่งมีชีวิต และสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต นำมาผลิตเป็น ไหมเย็บแผล และผ้าซับเลือด (Howells, 1982; Holmes, 1985) ในด้านการเกษตรได้นำ PHB มาทำเป็นเม็ด (pellet) เพื่อบรรจุสารจำพวกยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช เพื่อให้สารเหล่านี้มีฤทธิ์อยู่ได้นาน โดยค่อย ๆ ปล่อยสารเหล่านี้ออกมาตามแต่ปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้ (Holmes, 1985) ในอนาคตคาดว่าการผลิต PHB เพื่อนำมาทำสินค้าพลาสติกที่ย่อยสลายได้ จะเป็นวิธีแก้ปัญหาขยะพลาสติกที่ไม่ย่อยสลายได้ทางหนึ่ง

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีผลิตภัณฑ์ทางด้านนี้ออกสู่ตลาดบ้างแล้วก็ตาม แต่ในความเป็นจริงการผลิตในระดับอุตสาหกรรมยังคงมีน้อยอยู่ แม้แต่ในประเทศที่พัฒนาแล้วก็ตาม งานวิจัยยังคงมีอย่างต่อเนื่องเพื่อค้นหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ เพื่อใช้วัตถุดิบที่มีในท้องถิ่น และมีราคาถูก รวมทั้งพัฒนาวิธีการเพื่อให้การผลิตง่ายขึ้น ได้ปริมาณมากขึ้น และต้นทุนการผลิตต่ำลง ดังนั้นด้วยเหตุผลดังกล่าวงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการเลี้ยงเชื้อ และวิธีการในการเลี้ยงเชื้อเพื่อที่จะเพิ่มปริมาณการผลิต PHB จาก *Alcaligenes* sp. A-04 โดยอาจมีความเป็นไปได้ ในการลดต้นทุนการผลิตโดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนราคาถูก ซึ่งจะมีความเป็นไปได้ในการผลิต PHB ในระดับขยายส่วน