หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

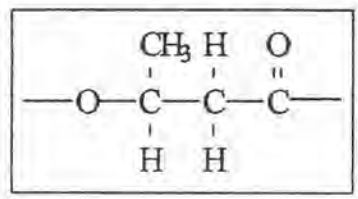
บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate)

2.1.1 คุณลักษณะของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นสารพอลิเอสเตอร์แบบโฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer) มีโมโนเมอร์ คือ 3-ไฮดรอกซีบิวทิริกแอซิด (3-hydroxybutyric acid) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเมื่อเป็นโมโนเมอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างของ 3-hydroxybutyric acid เมื่อเป็นโมโนเมอร์ (Byrom D., 1987)

พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1926 โดย Lemoigne จากสถาบันปาสเตอร์ กรุงปารีส (Anderson,1990) จากการศึกษาต่อมาพบว่า พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต นี้คือ แหล่งคาร์บอนสำรองสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ สามารถพบได้ในเชื้อจุลินทรีย์ทั่วๆ ไป จัดเป็นสารที่มีลักษณะคล้ายกับพวกไขมัน พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจะลอยเป็นก้อน อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์จุลินทรีย์โดยไม่มีเยื่อหุ้มล้อมรอบ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลแบบไม่มีขั้ว จึงแยกตัวออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ของไซโตพลาสซึม รวมกลุ่มกันเป็นก้อนที่เรียกว่า อินคลูชันบอดี (Inclusion body) โดยปกติพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สะสมอยู่ในเซลล์มักจะถูกล้อมรอบอยู่ด้วยโปรตีนหลายชนิด เชื่อกันว่าโปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้มีการค้นพบว่า เชื้อจุลินทรีย์จำนวนหลายชนิดสามารถสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตขึ้นได้ เชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นมีทั้งกลุ่มที่เป็นจุลินทรีย์ชนิดแกรมบวก และจุลินทรีย์ชนิดแกรมลบ นอกจากนั้นยังพบได้ว่า ในกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียก็มีความสามารถในการสังเคราะห์สารชนิดนี้ด้วย กลุ่มต่างๆ ของจุลินทรีย์เหล่านี้ ดังได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1

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	

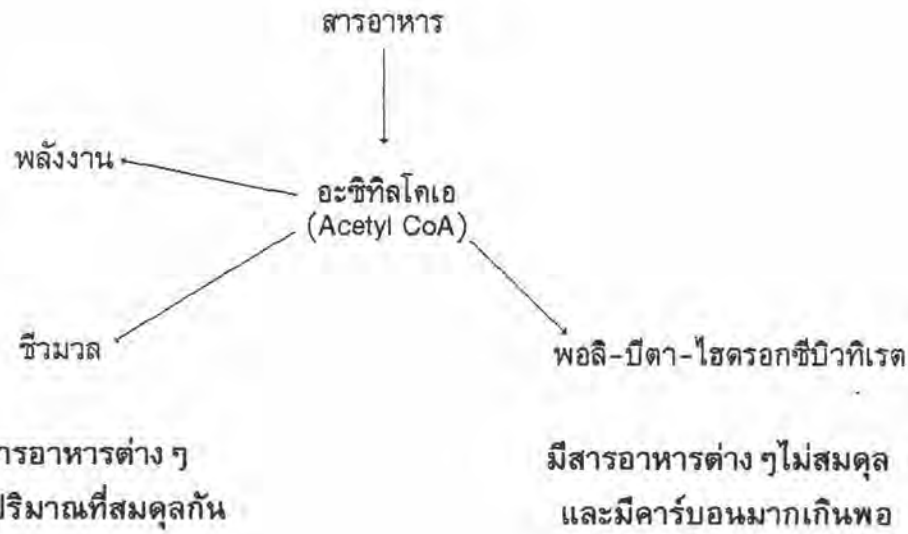
ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบว่า มีการสังเคราะห์และสะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ภายในเซลล์ (Byrom, 1987)

2.1.2 การสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

กระบวนการเมตาบอลิซึมของพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้แสดงสรุปไว้ในรูปที่ 2.2 กล่าวคือ การสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต จะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล และมีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ (Byrom, 1987) โดยเชื้อจุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้เป็นอะซิทิลโคเอ (Acetyl CoA) ตามขั้นตอน ซึ่งมักจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งถ้าหากเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในภาวะปกติมีสารอาหารต่างๆ สมดุลกันดี อะซิทิลโคเอที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนให้เป็นพลังงานและชีวมวล แต่ถ้าอยู่ในภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล และมีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ อะซิทิลโคเอที่เกิดขึ้นก็จะถูกเปลี่ยนให้เป็นพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต กลไกการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ และย่อยสลายพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต มีรายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 2.3

ในกระบวนการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต มีเอนไซม์ที่สำคัญอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ อะซิทิลโคเอ เอซิลทรานสเฟอร์เรส (Acetyl-CoA acyltransferase) ทำหน้าที่เปลี่ยนอะซิทิลโคเอ ให้เป็นอะซิโตอะซิทิลโคเอ (Acetoacetyl CoA) จากนั้นเอนไซม์อะซิโตอะซิทิลโคเอรีดัคเตส (acetoacetyl CoA reductase) ทำหน้าที่เปลี่ยนให้เป็น 3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (3-hydroxybutyryl CoA) ซึ่งต่อมาจะถูกเอนไซม์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตซินเทส (PHB

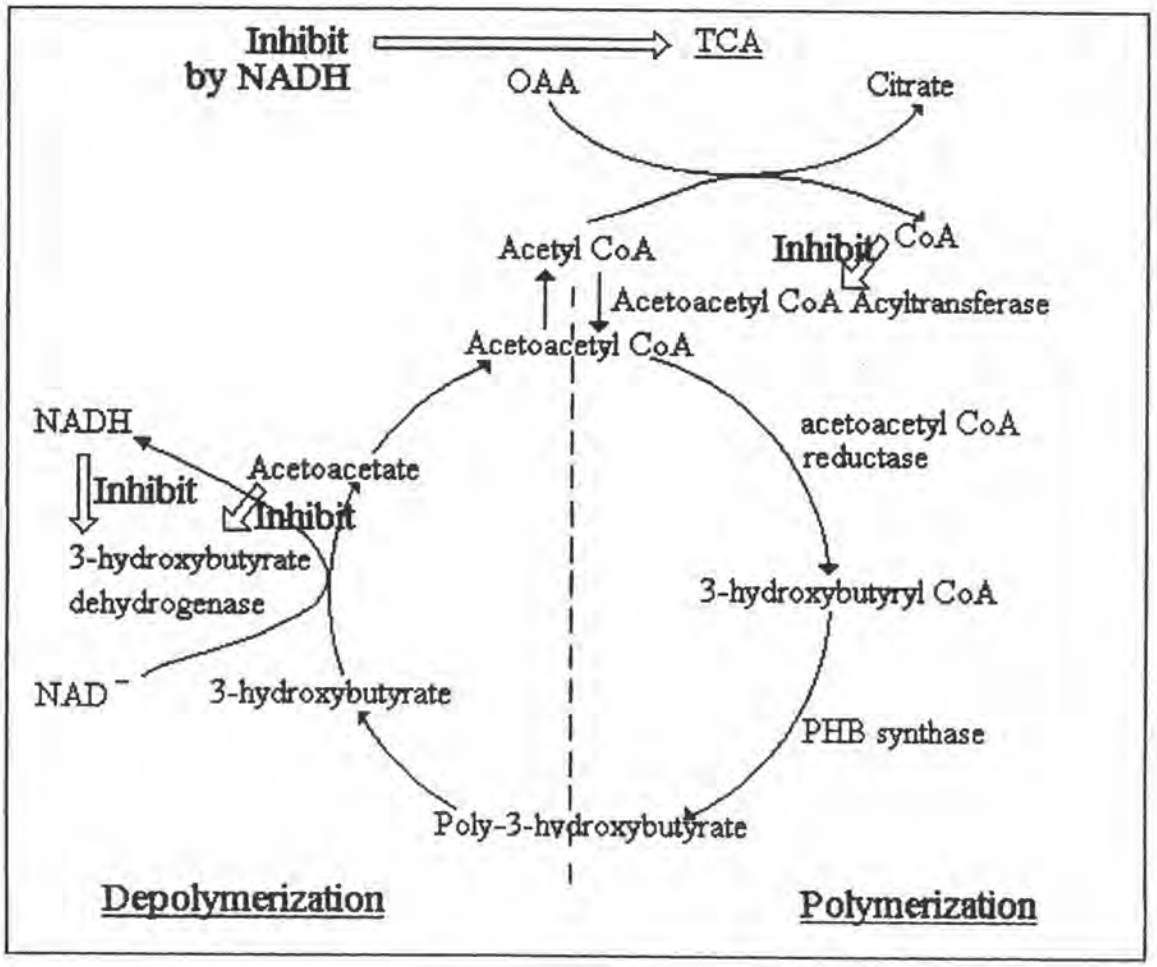
synthase) เชื่อมต่อให้เป็นพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ตามปกติเอนไซม์ชนิดแรก อะซิทิลโคเอ เอซิลทรานสเฟอร์เรสจะถูกยับยั้งด้วยโคเอนไซม์เอ (Coenzyme A) ที่อยู่อิสระซึ่งมักจะมีอยู่



รูปที่ 2.2 แสดงผลิตภัณฑ์จากอะซิทิลโคเอในภาวะที่มีสารอาหารสมดุล และในภาวะไม่สมดุลแบบมีคาร์บอนมากเกินพอ (Byrom, 1987)

ในปริมาณมาก ต่อเมื่อเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล และมีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ จะทำให้เกิด NADH และอะซิทิลโคเอ จากกระบวนการเผาผลาญแหล่งคาร์บอนในปริมาณมาก NADH ที่มีมากนี้จะทำหน้าที่ไปยับยั้งการเกิดวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิก (TCA Cycle) ทำให้จำนวนโคเอนไซม์เอที่อยู่อิสระ ซึ่งได้จากวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกมีปริมาณลดน้อยลง จากการที่เกิดมีอะซิทิลโคเอ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกริยาการสร้างพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตมากขึ้น และมีโคเอนไซม์เออิสระที่เป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตมีปริมาณลดน้อยลง จะส่งผลให้เอนไซม์อะซิทิลโคเอ เอซิลทรานสเฟอร์เรสทำงานได้ดีขึ้น เกิดการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตได้มากขึ้น

สำหรับกระบวนการเผาผลาญพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต มีเอนไซม์ที่สำคัญคือ 3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต ดีไฮโดรจีเนส (3-hydroxybutyrate dehydrogenase) เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งด้วย NADH ดังนั้นการเผาผลาญพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต จึงเกิดขึ้นในทิศทางที่สอดคล้องกับกระบวนการสังเคราะห์ นั่นคือ เมื่อสภาวะปริมาณสารต่างๆ ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์สนับสนุนให้เกิดการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ก็จะเป็นสภาวะที่จะทำให้เกิดการยับยั้งการเผาผลาญพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตไปด้วย และเมื่อสภาวะปริมาณสารต่างๆ ภายในเซลล์ส่งเสริมให้เกิดการเผาผลาญพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ก็จะเป็นสภาวะที่ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตไปด้วย



รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการควบคุมการสังเคราะห์และการย่อยสลายพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต(Byrom, 1987)

2.1.3 กระบวนการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

กระบวนการผลิตแบ่งออกเป็นสองขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ ขั้นตอนแรกทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้สังเคราะห์ และสะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต จนมีปริมาณมากตามต้องการ จากนั้นนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้เข้าสู่กระบวนการสกัดแยก และทำให้บริสุทธิ์เป็นขั้นตอนที่สอง

แนวทางการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต มีด้วยกันหลายรูปแบบ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต อยู่ด้วยกันหลายจำพวก ซึ่งแต่ละพวกก็มีความสามารถที่แตกต่างกัน ใช้สารตั้งต้นได้หลายประเภท แบ่งกระบวนการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในปัจจุบันออกได้ดังนี้

1. การผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก Alcaligenes eutrophus
2. การผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Methylotrophs
3. การผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก Escherichia coli ที่ผ่านการดัดแปลงสารพันธุกรรม

นอกจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆดังกล่าวแล้ว ยังคงมีเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ใช้อีกได้แก่ Alcaligenes latus , Azotobacter vinelandii เป็นต้น

2.1.4 การผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก Alcaligenes eutrophus

เชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการวิจัยค้นคว้าเพื่อใช้ผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตกันอย่างกว้างขวาง เนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มีความสามารถที่จะสะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ภายในเซลล์ได้มากถึงประมาณ 80% โดยน้ำหนักของเซลล์ โดยการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนง่ายๆ เช่น กลูโคส ในปัจจุบันมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ในกระบวนการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในระดับอุตสาหกรรมโดย ZENECA Bio Products, UK กระบวนการผลิตใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ด้วยกลูโคส ในแบบกึ่งต่อเนื่อง และใช้วิธีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต เพื่อกระตุ้นให้สังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตหลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ประมาณ 40 ชั่วโมง

Kim B. S.,1994 อาศัยการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้คงที่ที่ 10-20 กรัม/ลิตร ในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้สูงถึง 164 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 121 กรัม/ลิตร ซึ่งคิดเป็น 76% โดยน้ำหนัก ภายใน 50 ชั่วโมง หรืออัตราผลผลิตเท่ากับ 2.42 กรัม PHB/ลิตร-ชั่วโมง

เชื้อจุลินทรีย์ Alcaligenes eutrophus นอกจากจะใช้กลูโคสแล้ว ยังสามารถใช้ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อการเจริญเติบโต และสร้างพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตได้อีกด้วย ในปี 1994 Tanaka K. (Tanaka K. และคณะ, 1994) ได้ตีพิมพ์ผลการวิจัยการเพาะเลี้ยง Alcaligenes eutrophus ให้เจริญเติบโตในแบบออโตทรอฟฟิก (Autotrophic) โดยให้ก๊าซไฮโดรเจน ออกซิเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ผลจากการวิจัยพบว่า เมื่อใช้ถังหมักที่ถูกออกแบบมาเป็นพิเศษเพื่อป้องกันการระเบิดจากการป้อนก๊าซเข้าถังหมักมากเกินไป โดยถังหมักถูกออกแบบให้มีลักษณะการปั่นกวนแบบพิเศษ ซึ่งจะส่งผลทำให้ได้ค่า K_La มากเป็นพิเศษ และป้อนออกซิเจนเข้าถังหมักโดยควบคุมให้มีปริมาณต่ำกว่า 6 % ตลอดเวลา ได้ปริมาณเซลล์สูงถึง 91.3 กรัม/ลิตร และได้พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 61.9 กรัม/ลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะจำกัดปริมาณออกซิเจน เพื่อกระตุ้นให้สร้างพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตไปได้ 40 ชั่วโมง ได้อัตราผลผลิต 1.55 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง

2.1.5 การผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Methylotrophs

เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาค่อนข้างถูกอีกชนิดหนึ่ง ที่สามารถใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Methylotrophs เพื่อผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้มีงานวิจัยศึกษากระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อในกลุ่มนี้ดังนี้

Suzuki และคณะ (Suzuki T., 1986a) วิจัยกระบวนการผลิต พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ให้ได้ในปริมาณมากด้วยเทคนิคการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อในกลุ่ม methylotroph ซึ่งใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การขาดแคลนสารอาหารบางตัว เช่น NH_4^+, SO_4^{2-}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, หรือ Mn^{2+} จะกระตุ้นให้แบคทีเรีย *Pseudomonas sp. K* สังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเมธานอลขึ้นได้ในปริมาณมาก และใช้วิธีการทำให้เกิดการขาดแคลนไนโตรเจน จะทำให้สามารถผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยอาศัยวิธีการควบคุมอัตโนมัติ คุมอัตราการป้อนออกซิเจน และเมธานอลเข้าสู่ถังหมัก รักษาระดับอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส กระบวนการหมักแบ่งเป็นสองช่วง ช่วงแรกเป็นช่วงเร่งให้เจริญเติบโต ซึ่งใช้วิธีการป้อนไนโตรเจนเข้าถังหมักในรูปของแอมโมเนียมด้วยวิธีการแบบเติมสารป้อนเพื่อให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในถังหมักคงที่ (pH-stat) เมื่อได้ความเข้มข้นเซลล์ 160 กรัม/ลิตร จึงเปลี่ยนเข้าสู่ช่วงที่สอง คือ ช่วงสร้างผลิตภัณฑ์ ช่วงนี้หยุดป้อนไนโตรเจนเข้าสู่ถังหมัก โดยเปลี่ยนไปใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวปรับค่าพีเอชแทน และป้อนเมธานอลเข้าสู่ถังหมักอย่างเดียวเท่านั้น พบว่า ได้ปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดถึง 136 กรัม/ลิตร โดยใช้เวลาการหมัก 175 ชั่วโมง ได้ค่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบคาร์บอนในสารอาหารไปเป็นผลิตภัณฑ์ (yield) 0.18 กรัม PHB/กรัมเมธานอล และได้องค์ประกอบพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ภายในเซลล์เข้มข้นสูงสุด 66% ของน้ำหนักแห้ง

จากนั้น Suzuki และคณะ (Suzuki T.,1986b) ได้ศึกษาต่อมาและพบว่า การป้อนไนโตรเจนบ้างในปริมาณน้อยๆ ในช่วงสร้างผลิตภัณฑ์ (production phase) ให้แก่แบคทีเรีย Protomonas extorquens ที่ใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนที่จะหยุดป้อนเข้าเลย จะทำให้เกิดการสะสม พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ภายในเซลล์ได้รวดเร็วขึ้นมาก และถ้าหากป้อนเข้าในปริมาณที่มากเกินไปก็จะทำให้เกิดการย่อยสลายพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต นอกจากนี้ยังได้เสนอแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แสดงลักษณะทางจลนศาสตร์ของผลจากไนโตรเจนขึ้น โดยความหมายของแบบจำลองได้ว่า ในช่วงเริ่มต้นการสร้างผลิตภัณฑ์จะต้องป้อนแอมโมเนียมเข้าในปริมาณหนึ่ง จากนั้นจึงค่อยๆ ลดอัตราการป้อนเข้าลง โดยจะมีค่าขึ้นอยู่กับอัตราการเพิ่มปริมาณ พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมา Suzuki และคณะ (Suzuki T.,1986c) ได้นำไปสร้างรูปแบบการควบคุมอัตราส่วนของคาร์บอนกับไนโตรเจนในสารป้อน สำหรับกระบวนการหมักแบบกึ่ง

ต่อเนื่อง เพื่อการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเมธานอลโดยใช้แบคทีเรีย Protomonas extorquens ซึ่งเป็นการควบคุมค่าอัตราส่วนโดยพิจารณาจากค่าการเพิ่มปริมาณพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์ ผลจากงานวิจัยชิ้นนี้ ทำให้สามารถเพิ่มค่าอัตราผลผลิต (productivity) ขึ้นได้เป็น 1.124 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง จากเดิมซึ่งใช้วิธีการทำให้ขาดแคลนไนโตรเจนอย่างสิ้นเชิง ทำได้สูงสุดเพียง 0.777 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง และนอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มค่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบคาร์บอนในสารอาหารไปเป็นผลิตภัณฑ์ (yield) ขึ้นได้เป็น 0.2 กรัม PHB/กรัม เมธานอล

2.1.6 การผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก Escherichia coli ที่ผ่านการดัดแปลงสารพันธุกรรม

ตามสภาพธรรมชาติ Escherichia coli ไม่สามารถสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตขึ้นมาได้ แต่ได้มีการตัดต่อสารพันธุกรรมนำเอาสารพันธุกรรมของ Alcaligenes eutrophus ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเข้าไปใส่ใน Escherichia coli ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ดัดแปลงนี้สังเคราะห์ และสะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตขึ้นได้ (Schubert P. และคณะ, 1988, Slater C. S. และคณะ, 1988) สารพันธุกรรมที่ตัดต่อเข้าไปนี้จะแสดงออกโดยสังเคราะห์เอนไซม์ดังกล่าวในปริมาณที่คงที่ตลอดเวลา จุลินทรีย์ดัดแปลงนี้จะสามารถสะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ภายในเซลล์ได้สูงถึง 80-90% ของน้ำหนักแห้ง (Lee S. Y.,1995) การเพาะเลี้ยงสามารถกระทำได้โดยง่าย ได้แก่ ใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยเติมสารป้อนเข้าไปในด้วยวิธีการแบบเติมสารป้อนเพื่อให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในถังหมักคงที่ ผลที่ได้คือ สามารถผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตได้อัตราผลผลิตสูงถึง 2 กรัมPHB/ลิตร-ชั่วโมง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และนอกจากนี้ภายหลังจากที่เพาะเลี้ยงจนได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการแล้ว ยังสามารถสกัดเอาพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สะสมไว้ภายในเซลล์ออกมาได้โดยง่าย เนื่องจากในปัจจุบันได้มีการจัดสร้าง Escherichia coli ดัดแปลงที่สามารถจะย่อยสลายตัวเองได้โดยอาศัยเพียงแค่การเปลี่ยนอุณหภูมิ หรือค่าความเป็นกรดด่าง ซึ่งจะทำหน้าที่ชักนำให้สารพันธุกรรมที่สร้างเอนไซม์สำหรับย่อยสลายเซลล์เริ่มทำงานขึ้นมา (Flaschel E. และคณะ, 1993) ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นจะต้องใช้กระบวนการพิเศษใดๆ อีกเพื่อทำให้เซลล์แตก และนอกจากนี้กระบวนการสกัดแยกพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตในปัจจุบัน ขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกจะมีผลทำให้เกิดการสูญเสียพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตไปได้ การย่อยสลายเซลล์ Escherichia coli ดัดแปลง โดยอาศัยสารพันธุกรรมของตัวเชื้อจุลินทรีย์เอง จะทำให้การสูญเสียพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากกระบวนการสกัดแยกลดลงไปได้

จุดเด่นของกระบวนการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้ Escherichia coli ดัดแปลงมีด้วยกันหลายประการ คือ

1. โตเร็ว เพิ่มปริมาณได้มากในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งทำให้ได้ค่าอัตราผลผลิตสูงตามมา

2. สะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ภายในเซลล์ได้ในปริมาณมาก
3. สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกได้หลายชนิด
4. สกัดแยกพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตออกมาได้ง่าย
5. เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สังเคราะห์และสะสมไว้ได้

แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการเพาะเลี้ยง Escherichia coli ดัดแปลงนี้ยังคงมีปัญหาในหลาย ๆเรื่องได้แก่การสะสมอะซีเตทในระหว่างการเพาะเลี้ยงซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ E. coli ในเรื่องของความต้องการออกซิเจนระหว่างช่วงที่มีปริมาณเซลล์สูงมาก ๆ ในเรื่องของการระบายความร้อนที่เกิดจากการเผาผลาญอาหารของเชื้อ การระบายคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น และในเรื่องของการปั่นกวนเพื่อผสมในถังหมักเป็นต้น (Lee S.Y., 1996)

2.1.7 การสกัดแยกพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตและทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนโดยปกติประกอบด้วยการแยกเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นนำเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมได้ไปเข้ากระบวนการย่อยเซลล์ เพื่อทำให้เซลล์แตกออกและปลดปล่อยพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สะสมไว้หลุดออกมา หลังจากแยกเอากากชีวมวลออกจึงส่งเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

ในขั้นตอนแยกเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ออกจากน้ำหมัก ใช้วิธีการแยกเซลล์ตามปกติธรรมดา ซึ่งมักอาศัยกระบวนการแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง หรืออาศัยเพียงการกรองก็สามารถแยกเซลล์ออกมาจากน้ำหมักได้

สำหรับในขั้นตอนถัดไป ซึ่งเป็นการย่อยเซลล์ให้เซลล์แตก เพื่อแยกเอาพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่อยู่ภายในออกมา สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

- การย่อยเซลล์และสกัดพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตออกด้วยตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้กัน ได้แก่ คลอโรฟอร์ม (Choloform) เมทธิลีนคลอไรด์ (Methylene Chloride) โพรพิลีนคาร์บอเนต (Propylene Carbonate) และไดคลอโรอีเทน (Dichloroethane) (Lee S. Y., 1995) แต่กระบวนการสกัดพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตออกด้วยตัวทำละลายนี้จะได้สารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้นประมาณ 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร)PHB ซึ่งมีความหนืดสูงมาก ทำให้กระบวนการแยกเศษชีวมวลออกไปทำได้ยาก จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากจนให้ผลไม่คุ้มกับการลงทุน ถึงแม้จะมีการหมุนเวียนนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ (Hahn S.K. และคณะ, 1994)
- การย่อยเศษชีวมวลที่ไม่ใช่พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย วิธีนี้จะช่วยย่อยสลายเศษชีวมวลออกไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้น แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์จะไปย่อยสลายพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซี

บิวทิเรตด้วยเช่นกัน และนอกจากนี้ยังมีผลทำให้พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่แยกสกัดได้มีคุณสมบัติที่ไม่เหมาะกับการประยุกต์ใช้งานหลายๆ ด้าน

- การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เอนไซม์ กระบวนการนี้ประกอบด้วยการให้ความร้อนกับชีวมวล แล้วนำไปทำปฏิกริยาร่วมกับเอนไซม์ จากนั้นนำไปล้างด้วยสารละลายซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ เพื่อละลายเอาเศษชีวมวลออกจากพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ได้จากกระบวนการนี้ มักจะมีความบริสุทธิ์ที่ไม่สูงนัก ในกรณีที่ต้องการความบริสุทธิ์สูงๆ ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการแยกสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูงขึ้น

2.1.8 การประยุกต์ใช้พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

ในปัจจุบัน สารในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHA) กำลังเป็นที่สนใจในการค้ามากยิ่งขึ้น ในฐานะของวัสดุทดแทนพลาสติกที่สามารถย่อยสลายตัวเองได้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และคุณสมบัติที่มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible plastic) ซึ่งทำให้มีความสนใจที่จะใช้สารในกลุ่มนี้ ทำเป็นวัสดุสำหรับใช้ภายในร่างกายมากยิ่งขึ้นการนำวัสดุในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHA) ไปใช้ในงานด้านต่าง ๆ ดังได้แสดงการประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ที่เป็นไปได้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การประยุกต์ใช้สารในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในงานด้านต่างๆ ที่เป็นไปได้ (Lee S. Y., 1995)

- วัสดุสำหรับใช้ในงานหีบห่อ เช่น แผ่นฟิล์มพลาสติก ถุงใส่ของ กล่องต่าง ๆ
- สารหุ้มห่อย่อยสลายตัวเองได้สำหรับงานที่ต้องการค่อย ๆ ปลดปล่อยสารที่บรรจุอยู่ภายในให้ออกมาอย่างช้าๆ เป็นเวลานาน เช่น ยาบางชนิด ยาฆ่าแมลง สารกำจัดศัตรูพืช ปุ๋ย
- วัสดุใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น มีดโกน ผ้าอ้อมเด็ก ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพสำหรับสตรี
- ใช้ในกระบวนการผลิตสารประกอบที่ต้องการโครงสร้างที่บิดระนาบแสงในแนวเฉพาะ
- วัสดุสำหรับงานทางการแพทย์ เช่น วัสดุปิดแผล ดบแต่งแผล วัสดุสำหรับฝังในร่างกาย
- สารโครงสร้างสำหรับใช้ทดแทนกระดูก
- เส้นเลือดเทียม

ได้มีการผลิตสารในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ในงานด้านต่างๆ ขึ้นในทางการค้าหลายบริษัท แต่ในปัจจุบันมีเพียง ZENECA Bio Products เพียงแห่งเดียวที่ยังคงดำเนินการผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และพอลิไฮดรอกซีอัคาโนเอตในรูปแบบที่มี 3-ไฮดรอกซีบิวทิริกแอซิด (3-hydroxybutyric acid) เป็นโคพอลิเมอร์กับไฮดรอกซีวาเรอริกแอซิด (Hydroxyvalerric acid) หรือ P(3HB-*co*-3HV) สำหรับทางการค้าอยู่ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า

BIOPOL ด้วยกำลังการผลิตประมาณ 1000 ตันต่อปี มีวัสดุที่จัดสร้างขึ้นจาก BIOPOL ออกสู่ตลาดหลายชนิด เช่น ขวดบรรจุยาสระผม (SANARA) ของบริษัท Wella เยอรมัน วัสดุใช้ครั้งเดียวทิ้งต่างๆ เช่น มีดโกน กล่องบรรจุอาหาร ซึ่งมีออกวางขายในญี่ปุ่น

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีเพียงพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต P(3HB) และ P(3HB-*co*-3HV) เท่านั้นที่มีการใช้กันอยู่ กระบวนการต่างๆ ทางการค้าได้แก่ การผลิต การประยุกต์ใช้ยังอยู่ในภาวะเริ่มต้น ราคาของ BIOPOL และสารในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอื่นๆ ยังคงสูงอยู่ เมื่อเทียบกับราคาของพลาสติกสังเคราะห์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

2.2 การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (Fed-batch fermentation)

การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยอาศัยข้อมูลจากถังหมักเป็นข้อมูลย้อนกลับ มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณสูงๆ ภายในระยะเวลาอันสั้น ข้อมูลจากการวัดที่สามารถนำมาใช้ควบคุมค่าอัตราการเติมสารป้อนมีได้หลายชนิด ข้อมูลที่จะช่วยให้เพาะเลี้ยงได้มากและเร็ว ได้แก่ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อจุลินทรีย์

ในปี ค.ศ.1989 Agrawal และคณะ (Agrawal P.,1989) ได้ตีพิมพ์ผลงานวิจัยถึงวิธีการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารที่มีการพิจารณาใช้ค่าอัตราการเจริญเติบโตของจุลชีพเป็นข้อมูลย้อนกลับ เพื่อควบคุมอัตราการป้อนสารอาหารให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตลอดเวลา โดยทำการตรวจวัดติดตามค่าอัตราการเจริญเติบโตของ Candida utilis ในแบบออนไลน์ จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ทำการเปรียบเทียบกับค่าสูงสุดที่ได้เก็บไว้ จากนั้นปรับเปลี่ยนอัตราการป้อนสารอาหาร เพื่อปรับความเข้มข้นของสารอาหารในถังหมัก เพื่อให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดตลอดเวลา โดยไม่ต้องคำนึงถึงโมเดลทางคณิตศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเชื้อ จุลินทรีย์แบบใดๆ ซึ่งผลจากงานวิจัยพบว่า วิธีการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในแบบนี้ สามารถให้ผลการควบคุมได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความยืดหยุ่นสูง กล่าวคือ แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของสารป้อนอยู่ซึ่งมักจะเกิดอยู่เสมอในกรณีของกระบวนการหมักที่ใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติ วิธีการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในแบบนี้ ก็มีความสามารถที่จะรักษาระดับของค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไว้ที่ค่าสูงสุดอยู่ได้ นอกจากนี้ในกรณีที่การตรวจวัดค่าการเจริญเติบโตมีค่าที่แกว่งไปมาอันเกิดจากสัญญาณรบกวนต่างๆ (noise) มาก หรือมีค่าหน่วงเวลา (delay time) สูง ก็ยังสามารถรักษาระดับค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไว้ได้อย่างน่าพอใจ

จากงานวิจัยของ Agrawal และคณะข้างต้น แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการเพาะเลี้ยงให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณมากๆ ในระยะเวลาสั้นๆ โดยเพาะเลี้ยงให้โตเร็วที่สุดเท่าที่เชื้อจะสามารถโตได้ตลอดเวลา โดยข้อจำกัดของวิธีการ คือ ต้องสามารถวิเคราะห์หาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเวลาจริงให้ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งการวัดค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่สามารถจะวัดได้โดยตรง แต่จะทราบค่าได้โดยทำการวัดปริมาณเซลล์ที่เวลาจริง หรือ

ค่าอื่นๆ ที่จะสามารถนำไปสัมพันธ์กับค่าอัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์ได้ เช่น ค่าอัตราการหายใจ (Respiratory quotient), ค่าอัตราการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในก๊าซที่ออกจากถังหมัก (Carbon evolution rate) จากค่าที่วัดได้นำไปลดสัญญาณรบกวนลง จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Stephanopoulos G., 1984, Shimizu H. และคณะ, 1989)

Yamane T. และคณะ (Yamane T., 1992) ได้ใช้เครื่องเลเซอร์ เทอร์บิดิมิเตอร์ติดตามวัดค่าความเข้มข้นของเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ และติดตามค่าปริมาตรการเพาะเลี้ยงในแบบเวลาจริง โดยอาศัยเครื่องวัดน้ำหนักของถังหมักเชื่อมต่อกับเครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อใช้ควบคุมอัตราการเติมสารป้อนในการเพาะเลี้ยง Escherichia coli HB101 พบว่า สามารถใช้วิธีนี้เพื่อควบคุมการเติมสารป้อนโดยอัตโนมัติได้เป็นที่น่าพอใจ การวัดค่าปริมาณเซลล์ด้วยเครื่องเลเซอร์ เทอร์บิดิมิเตอร์ให้ผลการวัดที่ค่อนข้างแม่นยำ สามารถลดสัญญาณรบกวนที่เกิดจากฟองอากาศโดยใช้วิธีการเฉลี่ยค่าทุกช่วง 10 วินาที