

บทที่ 1

บทนำ



ในปัจจุบันปัญหาสภาวะแวดล้อมที่ความรุนแรงขึ้นมาก ส่วนหนึ่งมาจากขยะพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ (synthetic polymer) รวมถึงสภาวะเรือนกระจกของโลกอันเนื่องมาจากสารคลอโรฟลูออโรคาร์บอน (CFC) ที่ใช้กันในกระบวนการผลิตพลาสติกและโฟม ทางแก้ไขที่ดีทางหนึ่ง คือ การหันมาใช้พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable polymer) เช่น หันมาใช้พลาสติกที่ผลิตจากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHA) ที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เป็นต้น

เดิมพลาสติกที่ใช้กันแพร่หลายในท้องตลาดส่วนใหญ่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีซึ่งสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและมีต้นทุนต่ำ เช่น พอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride; PVC) พอลิโพรไพลีน (polypropylene; PP) หรือพอลิเอทิลีน (polyethylene; PE) ซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ก่อให้เกิดปัญหาของการเป็นสารเหลือทิ้งตกค้างและยากต่อการกำจัดในปัจจุบัน แม้จะมีการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยแสงอาทิตย์ (photodegradable polymer) น้ำ หรือรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ซึ่งมีสารจำพวกแบ่งเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ก็มีอาจลดปัญหาสภาวะแวดล้อมได้มากนัก เพราะยังมีส่วนของพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้เหลือตกค้างอยู่ เพื่อจัดปัญหาดังกล่าวจึงเริ่มมีการนำพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ (Evan และ Sikdar, 1990) สารพอลิเอสเตอร์ (polyester) จำพวกพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (รูปที่ 1-1) เป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และสามารถหมუნเวียนทำให้เกิดความสมดุลในสิ่งแวดล้อม (รูปที่ 1-2) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีใกล้เคียงกับพลาสติกในกลุ่ม PVC PP และ PE สามารถนำมาใช้ผลิตสารจำพวกพลาสติกที่สามารถนำไปใช้ในรูปลักษณะของฟิล์ม ใบบอร์ หรือหล่อให้เป็นรูปร่างต่าง ๆ ได้ตามต้องการ (Byrom, 1987) โดยในปี 1982 บริษัท ICI (Imperial Chemical Industries) ได้มีการผลิตขวดบรรจุแชมพูสระผมที่ผลิตมาจาก PHA ออกสู่ตลาดภายใต้เครื่องหมายการค้าไบโอโพล (biopol) (Marchessault และคณะ, 1988)

แต่เนื่องจากการผลิต PHA ยังมีต้นทุนที่สูง จึงน่าสนใจที่จะมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำพอลิเมอร์นี้มาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ เพื่อหาวิธีการลดต้นทุนการผลิต และผลิตให้พอลิเมอร์มีคุณสมบัติหลากหลายเพื่อประโยชน์ในรูปแบบการใช้เฉพาะอย่างต่อไป

### การตรวจเอกสาร

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นสารประเภทพอลิเอสเทอร์ของกรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิก ซึ่งแบคทีเรียหลายชนิดสังเคราะห์ขึ้นได้ในภาวะที่ขาดแคลนอาหาร(แหล่งอาหารคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันมาก)เพื่อการเจริญการอยู่รอด (Anderson และ Dawes, 1990) และเป็นแหล่งอาหารสำรอง (Preiss, 1989) โดยสะสมเป็นลักษณะของกรานูลภายในไซโตพลาซึมของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA มีมากมาย เช่น *pseudomonads*, *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii*, *Rhodococcus ruber*, methylotrophs และ recombinant *Escherichia coli* เป็นต้น (Lee, 1996) ในสภาพธรรมชาติพบว่ามีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์และสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydroxybutyrates; PHB) ได้ดังตารางที่ 1-1

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดแรกที่ถูกค้นพบคือ พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต ค้นพบโดย Lemoigne (1926) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและสังเกตการสร้าง PHB ของ *Bacillus* spp. พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดสปอร์ (sporulation) ซึ่งมีการสะสมของก้อนไขมัน (lipid inclusion) ในช่วงการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ของแบคทีเรีย เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานภายในเซลล์ ซึ่งการสร้างเกิดจากการถูกจำกัดสารอาหารที่จำเป็น รูปแบบโครงสร้างของ PHB ได้ถูกรายงานครั้งแรกโดย Dunlop และ Robards (1973) ต่อมา มีผู้ศึกษาหาสูตรโครงสร้างกันมาก พบว่า PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ที่มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยโมโนเมอร์ คือ กรดไฮดรอกซีบิวทีริก (3-hydroxybutyric acid) มาต่อกันเป็นสายยาวโดยเฉลี่ยตั้งแต่ 23,000 - 25,000 หน่วย (Byrom, 1987)

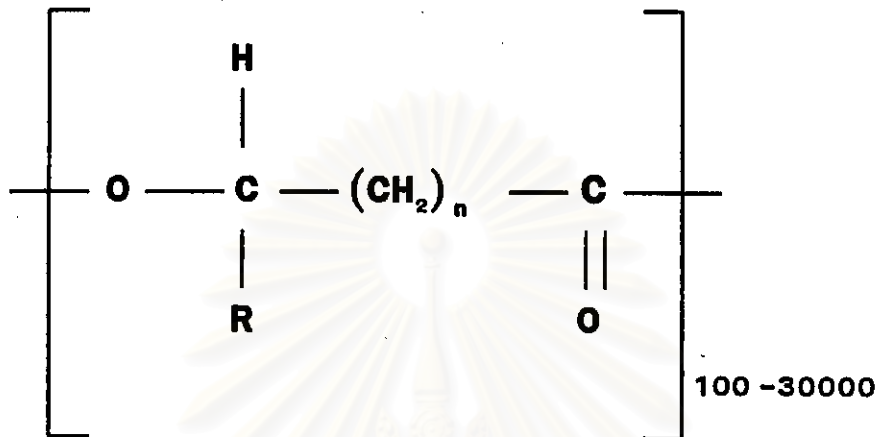
ในขณะเดียวกันได้มีผู้ศึกษาการย่อยสลายของ PHB พบว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพอลิเมอร์ (depolymerization) ภายในเซลล์และการหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ (polymerization) ดังรูปที่ 1-3 แสดงการสังเคราะห์และการย่อยสลายของ PHB ภายใต้ภาวะที่มีแหล่งคาร์บอน

มากเกินไป พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดมีเอนไซม์ที่ควบคุมการเมตาบอลิซึมของ PHB คือ อะเซทิลโค เอ เอซิลทรานสเฟอเรส (acetyl CoA acryl transferase) ซึ่งจะถูกยับยั้ง (inhibit) โดย โคเอนไซม์ เอ อิสระ (free coenzyme A) ที่มีความเข้มข้นสูง ภายใต้ภาวะสมดุลระดับ CoASH จะสูง ทำให้การสร้าง PHB ถูกยับยั้ง แต่ในภาวะถูกจำกัดสารอาหาร (nutrient limitation) แต่มี แหล่งคาร์บอนมากเกินไป จะมีการสร้าง NADH ขึ้นมายับยั้งเอนไซม์ซิเตรตซินเทส (citrate synthase) ทำให้ระดับของเอนไซม์อะเซทิล โค เอ (acetyl CoA) สูงขึ้นถึงระดับที่สามารถยับยั้ง CoASH ทำให้เกิดปฏิกิริยาการรวมกัน (condensation) ของอะซิโตอะเซทิล โคเอ (acetoacetyl CoA) นำไปสู่การสังเคราะห์ PHB ขึ้น (polymerization)

ส่วนการย่อยสลายพอลิเมอร์ถูกควบคุมผ่านการออกซิเดชันของสายโมโนเมอร์ (3-hydroxybutyrate monomer) โดยเอนไซม์ 3-ไฮดรอกซีบิวทีเรตดีไฮโดรจีเนส (3-hydroxybutyrate dehydrogenase) จะยับยั้งการเกิดอะเซโตอะซิเตท (acetoacetate) และ NADH ทำให้ได้ 3HB อิสระ ซึ่งการควบคุมของวัฏจักรทั้งหมดนี้ เกิดขึ้นเชื่อมโยงกับวัฏจักร TCA ในเซลล์จุลินทรีย์ทั่วไป

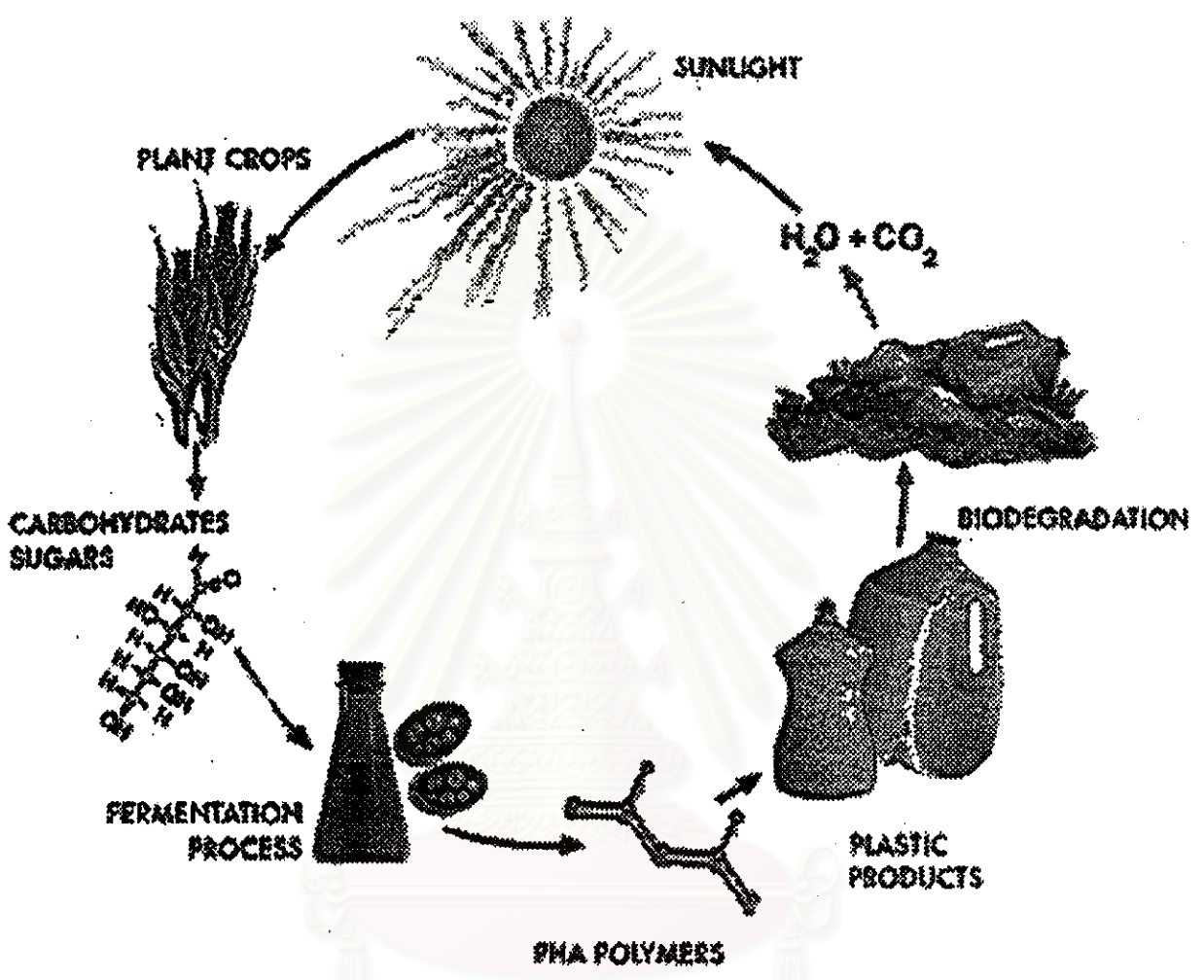
จากการค้นพบ PHB ในจุลินทรีย์และทราบว่า PHB นี้สามารถย่อยสลายได้หมดทุกส่วน ในธรรมชาติ (biodegradable polymer) โดยตัวจุลินทรีย์เอง บริษัท ICI ได้วิจัยพบว่า PHB เป็น เทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิโพรไพลีน (polypropylene) (King, 1982) แต่เนื่องจาก PHB มีจุดหลอมเหลวประมาณ 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส ทำให้ ต้องใช้พลังงานสูงมากในการหลอมรวม (ตารางที่ 1-2 และ 1-3) อีกทั้งไม่สามารถละลายได้ใน เอทานอลที่ร้อน มีความแข็งและเปราะกว่า PHA จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม จึงได้มีการพัฒนาให้จุลินทรีย์ที่สร้างได้แต่ PHB เดิมมาผลิตให้ได้พอลิเมอร์ที่มีคาร์บอน มากกว่า 4 ตัวเป็นองค์ประกอบ โดย Homes (1985) ได้รายงานถึง *Alcaligenes eutrophus* mutant สามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ (copolymer) ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ คือ 3HB และ 3HV เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โคพอลิเมอร์นี้เมื่อนำมาปรับปรุงมีคุณสมบัติสามารถนำมาทำก้อนพลาสติกเพื่อทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ได้ จึงมีผู้ค้นคว้าวิจัยต่อมากันมาก

รูปที่ 1-1 สูตรโครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Lee, 1996)



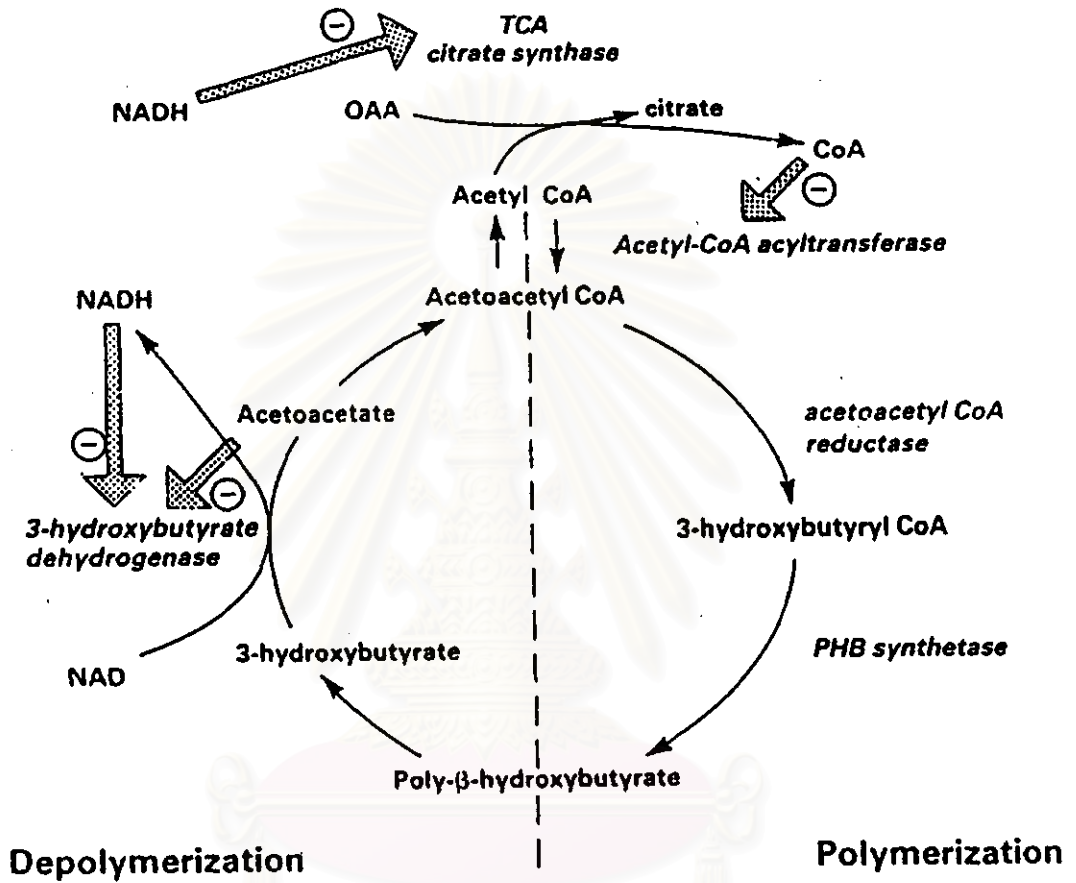
		Polymer
n = 1	R = hydrogen	Poly ( 3 - hydroxypropionate )
	R = methyl	Poly ( 3 - hydroxybutyrate )
	R = ethyl	Poly ( 3 - hydroxyvalerate )
	R = propyl	Poly ( 3 - hydroxyhexanoate )
	R = pentyl	Poly ( 3 - hydroxyoctanoate )
n = 2	R = hydrogen	Poly ( 4 - hydroxybutyrate )
n = 3	R = hydrogen	Poly ( 5 - hydroxyvalerate )

รูปที่ 1-2 วงจรของการใช้พลาสติกที่ย่อยสลายในธรรมชาติ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1-3 วัฏจักรการสังเคราะห์และการสลาย PHB (Byrom, 1987)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1-1 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHB ในธรรมชาติได้ (Byrom, 1987)

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

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1-2 คุณสมบัติทางกายภาพของ PHA และ PHB (WallenและRohwedder,1974 )

PHA	PHB
ของแข็งสีขาว	ของแข็งสีขาว
ละลายในคลอโรฟอร์ม	ละลายในคลอโรฟอร์ม
ตกตะกอนด้วยอีเธอร์	ตกตะกอนด้วยอีเธอร์
จุดหลอมเหลว 97 ถึง 100 องศาเซลเซียส	จุดหลอมเหลว 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส
ละลายในเอทานอลที่ร้อน	ไม่ละลายในเอทานอลที่ร้อน
เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก	เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก
เป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ประกอบด้วยกรดไฮดรอกซีที่มีคาร์บอน ตั้งแต่ 4 อะตอม ขึ้นไป	เป็นโฮโมพอลิเมอร์ประกอบด้วยกรดไฮดรอกซีที่มีคาร์บอน 4 อะตอม

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 1-3 เปรียบเทียบคุณสมบัติของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ (Lee ,1996)

Polymer	Melting temp. ( °C )	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (Mpa)	Elongation to break (%)	Notched izod impact strength (J/m)
P(3HB)	179	3.5	40	5	50
P(3HB-co-3HV)					
3 mol % 3HV	170	2.9	38	- <sup>a</sup>	60
9 mol % 3HV	162	1.9	37	-	95
14 mol % 3HV	150	1.5	35	-	120
20 mol % 3HV	145	1.2	32	-	200
25 mol % 3HV	137	0.7	30	-	400
P(3HB-co-4HV) <sup>b</sup>					
3 mol % 4HB	166	-	28	45	-
10 mol % 4HB	159	-	24	242	-
16 mol % 4HB	-	-	26	444	-
64 mol % 4HB	50	30	17	591	-
90 mol % 4HB	50	100	65	1080	-
P(4HB) <sup>c</sup>	53	149	104	1000	-
P(3HHx-co-3HO) <sup>d</sup>	61	-	10	300	-
Polypropylene	170	1.7	34.5	400	45
Polyethylene terephthalate	262	2.2	56	7300	3400
Polystyrene	110	3.1	50	-	21

<sup>a</sup> Data not available.

<sup>b</sup> Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate).

<sup>c</sup> Poly(4-hydroxybutyrate).

<sup>d</sup> Poly(3-hydroxyhexanoate-co-3hydroxyoctanoate).

รูปที่ 1-4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงกราบูลของ PHB ใน *Alcaligenes eutrophus* (Byrom, 1987)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

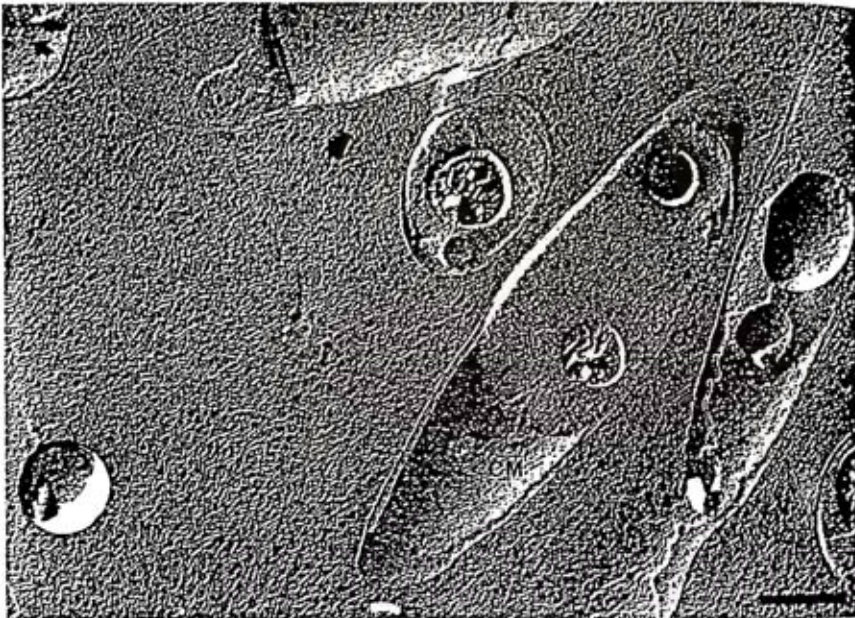
การพัฒนาครั้งสำคัญได้ถูกรายงานในปี 1983 โดย De Smet และคณะ ศึกษาการสร้าง พอลิเมอร์ในจุลินทรีย์ต่างๆ นำไปสู่การสังเกตพบว่า fluorescent pseudomonads จะไม่สร้าง และสะสม PHB ในเซลล์ แต่จะสร้างรูปแบบใหม่เป็น PHA สายยาว (long chain polyhydroxy alkanate elastomers) โดยพบว่า *Pseudomonas oleovorans* เมื่อเลี้ยงใน นอร์มอลออกเทน (n-octane) 50% (v/v) จะสะสมทรานลูที่มีลักษณะคล้าย PHB (รูปที่ 1-5) เมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่า เป็นพอลิเอสเทอร์ที่มีโมโนเมอร์เป็นองค์ประกอบหลัก คือ กรดไฮดรอกซีออกตาโนอิก (3-hydroxyoctanoic acid) มีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_8H_{14}O_2$  ต่อมา Lageveen และคณะ (1988) ได้ ยืนยันการค้นพบของ De Smet และรายงานถึงทรานลูในเซลล์ของ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 นั้นประกอบด้วยกรดไฮดรอกซีออกตาโนอิกและกรดไฮดรอกซีเฮกซาโนอิก (3-hydroxyhexanoic acid) เป็นองค์ประกอบหลักและองค์ประกอบรองตามลำดับ มีผู้ศึกษาวิจัย โดยเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในแหล่งคาร์บอนต่างๆที่ให้ในปริมาณ มากเพียงพอแต่ให้แหล่งไนโตรเจนน้อยมากและถูกจำกัดเพื่อส่งเสริมการสร้าง PHA (ตารางที่ 1-4) จะเห็นว่าเมื่อให้อัลเคน (n-alkane) ที่มีคาร์บอนตั้งแต่  $C_6$  ถึง  $C_{12}$  เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอน คือ ออกเทน(octane) โนเนน(nonane) และดีเคน (decane) จะให้ ปริมาณ PHA (%w/w) สูงสุดในกลุ่ม เมื่อใช้แอลกอฮอล์ที่มี  $C_6$  ถึง  $C_{10}$  เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าจะให้ปริมาณ PHA (%w/w) ในเกณฑ์ต่ำ แต่เมื่อใช้อัลคานอเอต(n-alkanoates)เป็นแหล่ง คาร์บอน พบว่า *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ใน ปริมาณที่สูงที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีออกตาโนเอต (octanoate) และโนนาโนเอต (nonanoate) ให้ PHA ถึง 41 และ 49 กรัม%w/w ตามลำดับ โดยความเข้มข้น ของอัลคานอเอตที่เหมาะสม คือ 10 มิลลิโมลาร์ เมื่อพิจารณาโมโนเมอร์ของ PHA ที่จุลินทรีย์ สังเคราะห์ จะเห็นว่าองค์ประกอบหลักของโมโนเมอร์ที่สร้าง(จำนวนคาร์บอน)จะมีความสัมพันธ์ กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ (จำนวนคาร์บอนของแหล่งอาหาร)

สายพันธุ์ fluorescent pseudomonads อยู่ในกลุ่ม RNA homology ที่ 1 มีความ สามารถที่จะสะสม PHA ได้เมื่อมี 3-hydroxy fatty acid เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน (Huisman G.W. และคณะ, 1988; Timm และ Steinbuchel, 1991) สัดส่วนของโมโนเมอร์ในพอลิเอสเทอร์นี้ มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับระบบเอ็นไซม์ PHA พอลิเมอร์เรส (PHA polymerase) ธรรมชาติ ของสารตั้งต้นที่ให้(substrate) และเส้นทางการสังเคราะห์ PHA (Eggink, G และคณะ, 1992)

Huijberts, G.N.M. และคณะ (1994) ได้ศึกษากลไกการสังเคราะห์ PHA ใน *Pseudomonas putida* KT2442 จากแหล่งคาร์บอนที่ติดฉลากด้วย  $^{13}\text{C}$  พบว่ากลไกการสร้างเกิดขึ้นผ่านกระบวนการ  $\beta$ -oxidation และกระบวนการ de novo fatty acid biosynthesis เมื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี  $1\text{-}^{13}\text{C}$  ออกตาโนอิคแล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) ใน *Pseudomonas putida* KT2442 นั้น พบว่าโมโนเมอร์ส่วนใหญ่ที่สร้าง (97%) คือ กรด 3-ไฮดรอกซีออกตาโนอิค และ 3-ไฮดรอกซีเฮกซาโนอิค โดยเกิดขึ้นผ่านเพียงกระบวนการ  $\beta$ -oxidation เท่านั้น ในขณะที่ อีก 3% ไม่ได้ผ่านกระบวนการ  $\beta$ -oxidation แต่เกิดการ elongation โดยรวมกับ อะเซทิล โค เอ ที่ได้จากกระบวนการ  $\beta$ -oxidation กลายเป็นกรด 3-ไฮดรอกซีเดคาโนอิค และน้อยกว่า 1 % ผ่านกระบวนการ  $\beta$ -oxidation แล้วเข้าสู่กระบวนการ de novo fatty acid biosynthesis ได้ 3-hydroxy fatty acid อื่นๆ ดังรูปที่ 1-7 เมื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี  $1\text{-}^{13}\text{C}$  เฮกซาโนอิคใน *Pseudomonas putida* KT2442 พบว่า โมโนเมอร์ส่วนใหญ่ที่สร้าง คือ กรด 3-ไฮดรอกซีเฮกซาโนอิค โดยเกิดขึ้นผ่านเพียงกระบวนการ  $\beta$ -oxidation เท่านั้น โดยมีรูปแบบการสังเคราะห์คล้ายกับในรูปที่ 1-8

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1-5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (freeze-fracture electron microscopy) แสดงการจับของ PHA ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 เมื่อเลี้ยงในนอร์มอลออกเทน 50% (v/v) (De Smet และคณะ, 1983)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1-6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงกรานูลของ PHA ใน *Pseudomonas oleovorans* ATCC29347 เมื่อเลี้ยงใน นอร์มอลออกเทน 50% (v/v) (Lageveenและคณะ,1988)

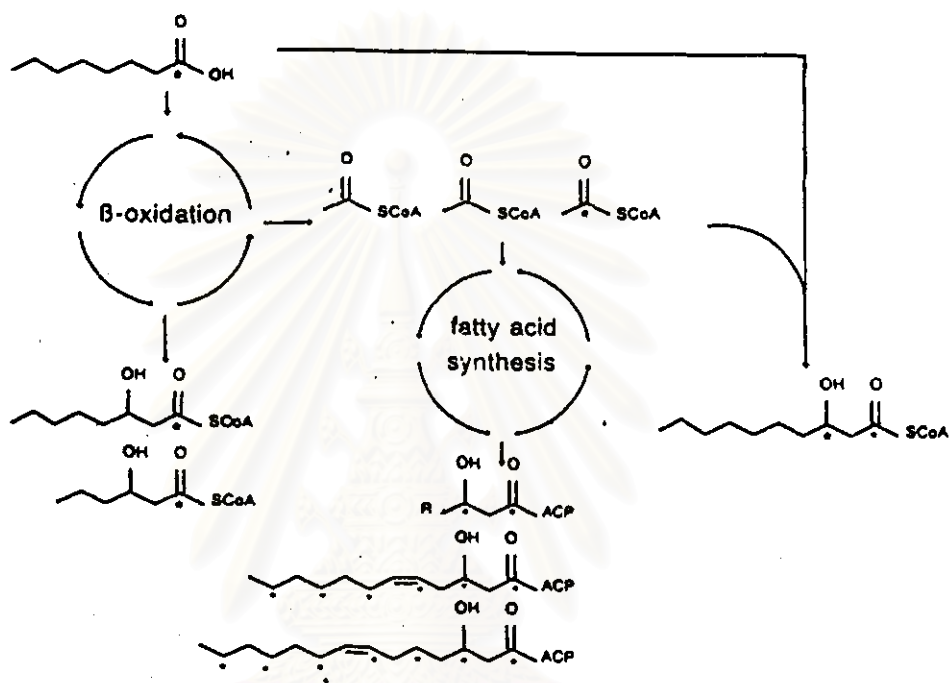


ตารางที่ 1-4 องค์ประกอบของ PHA ที่ผลิตโดย *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 เมื่อเจริญใน อัลเคน กรดอัลคานอิก และแอลกอฮอล์  
( Anderson และ Dawes,1990 )

Carbon source	PHA (%w/w)	3-Hydroxyacid monomers in PHA (mol%)									Reference
		C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	
Alkane											
Hexane	2	*	-	100	-	-	-	-	-	-	Lageveen และคณะ (1988)
Heptane	11.4	-	-	-	100	-	-	-	-	-	
Octane	25.3	-	-	11	-	89	-	-	-	-	
Nonane	24.3	-	-	-	37	-	63	-	-	-	
Decane	21.9	-	-	10	-	66	-	24	-	-	
Undecane	14.3	-	-	-	23	-	63	-	14	-	
Dodecane	5.8	-	-	2	-	31	-	36	-	31	
Alkanoate											
Hexanoate	5	3	<1	72	-	22	-	3	-	-	Gross และคณะ (1989)
Heptanoate	22	-	7	<1	86	<1	7	-	-	-	
Octanoate	41	<1	1	6	-	75	-	17	-	-	
Nonanoate	49	-	3	<1	20	5	72	-	-	-	
Decanoate	37	<1	1	7	-	44	-	47	-	<1	
Alcohol											
Octanol	15	-	-	6	-	91	-	3	-	-	Haywood และคณะ (1990)
Nonanol	33	-	-	-	27	-	73	-	-	-	
Decanol	6	-	-	-	-	63	-	37	-	-	

\* Data not report.

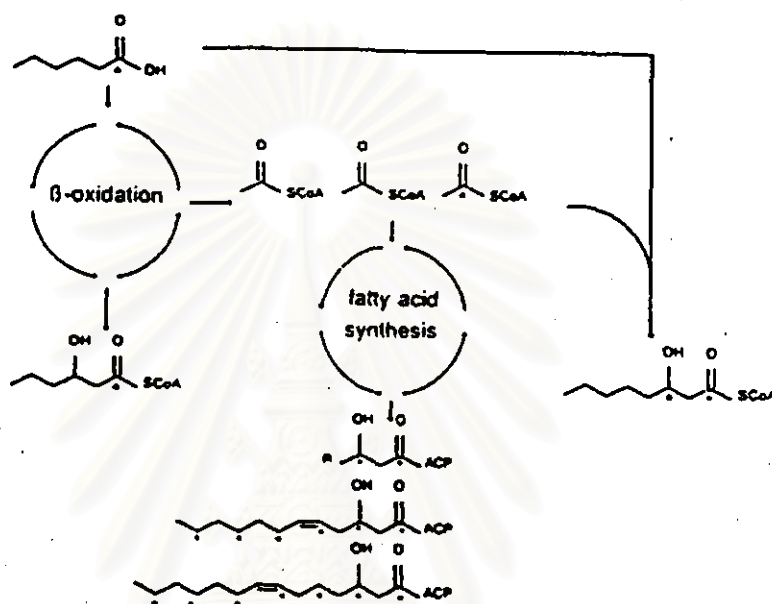
รูปที่ 1-7 กลไกการสังเคราะห์ PHA ใน *Pseudomonas putida* KT2442 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี  $1-^{13}\text{C}$  ออกตาโนอิค (Eggink,G.และคณะ,1995)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1-8 กลไกการสังเคราะห์ PHA ใน *Pseudomonas putida* KT2442 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี  $1-^{13}\text{C}$  เฮกซานอยด์ (Huijberts, G.M. และคณะ, 1994)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1-9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะจุลินทรีย์ *Pseudomonas* spp.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*Pseudomonads* กับการสร้างสารชีวภาพอื่น(นอกเหนือจากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต)

*Pseudomonas* spp.(รูปที่ 1-9)เป็นแบคทีเรียรูปแท่งย้อมติดสีแกรมลบ สามารถเคลื่อนที่(motile)ได้ บางชนิดสามารถสร้างเม็ดสี(pigment)ได้ พบได้ทั่วไปทั้งแหล่งน้ำและพื้นดิน เช่น *Pseudomonas fluorescens* บางชนิดก่อให้เกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาส(เป็นopportunistic pathogens) กับผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ(compromised host)ได้ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น (Baron,1994)

*Pseudomonas* spp. มีความสามารถในการสร้างสารชีวภาพได้หลายชนิด อาทิเช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Anderson,1990) เม็ดสี(pigment)(Lennette,1985) และพอลิแซคคาไรด์ที่ขั้วออกมาภายนอกเซลล์ (exopolysaccharides; EPS) (Sutherland,1977) เป็นต้น

Brown และคณะ (1969) ได้ศึกษาถึง EPS จาก *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าเป็นส่วนประกอบของเมือกที่ห่อหุ้มตัวเซลล์ไว้ (complex exocellular slime) มีกลูโคส แมนโนส และกรดนิวคลีอิกเป็นองค์ประกอบหลัก สร้างขึ้นเพื่อห่อหุ้มและปกป้องตัวเซลล์ไว้ ต่อมา Evans และ Linker (1973) ศึกษา EPS จาก *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าเกิดจากการรวมกันของD-mannuronate (M) กับ L-gulonate (G) โดยเชื่อมกันที่พันธะ  $\beta$ -1-4 glycosidic bonds (รูปที่1-10ข) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับอัลจินเตที่ได้จากสาหร่ายทะเลที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมโดยสัดส่วนของ M และ G ที่แตกต่างกันส่งผลกระทบถึงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้น Fett และคณะ (1995) ศึกษา*pseudomonads*ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเห็ด (mushroom production-associated fluorescent *pseudomonads*) จำนวน 63 สายพันธุ์ พบว่าแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างEPSได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ ดังตารางที่ 1-5

EPS นั้นนิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม โดยเป็นตัวประสาน(emulsifier)ให้สารละลายขึ้นเหนียว โดยมีศักยภาพที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพอลิแซคคาไรด์จากพืชและสาหร่ายทะเลที่เคยใช้กันในทางอุตสาหกรรม

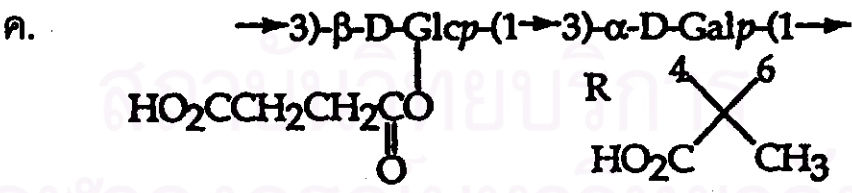
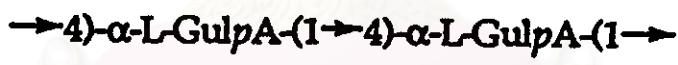
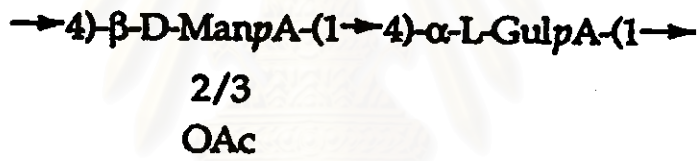
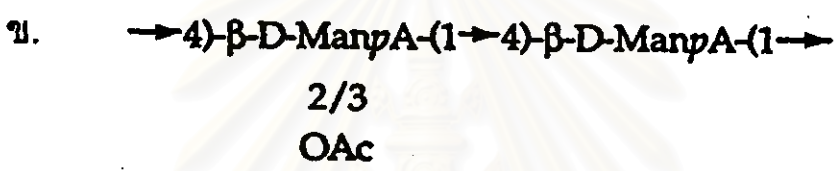
ตารางที่ 1-5 exopolysaccharides ที่สร้างจาก mushroom production - associated fluorescent pseudomonads (Fett และคณะ, 1995)

Bacterial strain	Yield of EPS (mg)	EPS production			
		Marginalan	Alginate	Unique	Levan
<i>P. fluorescens</i>					
J1	35-70	-	+	-	+
H13	7-30	-	-	+	-
B4, B14, B15, B20, B22, D12, G13, G19, K17, H6, H8, H9, H11, H16, H21, I15, I19, I22, I23, J12, J19, L16, L23, L24	8-79	+	-	-	-
<i>P. gingeri</i>	8-32	-	-	+	+
Pf2, Pf3, Pf9, Pf11, Pf13, Pf31, K20, K23					
<i>P. putida</i> all strains	25-58	+	-	-	-
<i>P. reactans</i>					
ATCC 14340, H23, K15, K16, L18	12-55	-	+	-	-
C7, C11, L5	23-43	+	-	-	-

รูปที่ 1-10 โครงสร้างของ EPS แต่ละชนิดที่สร้างโดย fluorescent pseudomonads

(Fett และคณะ, 1995)

- ก. Levan
- ข. Alginate
- ค. Maginalan



( Fru,Fructose; ManA,manuronic acid; GulA, guluronic acid; OAc, O-acetyl group substituted at the 2 and/or 3 position of manuronic acid; Glc, glucose; Gal, galactose; f, furanose from of the sugar; p, puranose from of the sugar )

## มูลเหตุจูงใจ

เนื่องจาก *Pseudomonas* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารชีวภาพได้หลายประเภท มีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมอาหาร และวัสดุทางการแพทย์ เป็นต้น ถ้าเราให้จุลินทรีย์ใช้สารอาหารพื้นฐาน คือ กลูโคสร่วมกับโซเดียมออกตาโนเอตในการเมตาบอลิซึม แล้ววิเคราะห์ว่าจุลินทรีย์สามารถสร้างสารชีวภาพชนิดใดได้ จะเป็นแนวทางทำให้เราสามารถควบคุมภาวะการผลิตเพื่อให้เราได้สารชีวภาพที่เราต้องการ โดยในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ซึ่งได้รับการยืนยันแล้วว่า เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสามารถสร้างPHAได้(Lageveen และคณะ,1988) มาศึกษาถึงกระบวนการสร้างสารชีวภาพอันได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พอลิแซคคาไรด์ และสารชีวภาพอื่น เมื่อมีอาหารทั้งกลูโคสและอัลคาโนเอตเพื่อเป็นแนวทางควบคุมให้จุลินทรีย์สามารถผลิตสารชีวภาพได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน เพื่อลดต้นทุนการผลิตและเพื่อประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

## ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. เลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 ในอาหารสูตรเกลือแร่ E ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 3 รูปแบบ
2. วิเคราะห์ PHA ที่ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 สร้างขึ้น
3. วิเคราะห์ EPS ที่ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 สร้างขึ้น
4. วิเคราะห์สารชีวภาพอื่น ที่ *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 สร้างขึ้นแล้ว  
ขับออกมาภายนอกเซลล์