บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

แนวคิดและทฤษฎี

ปัจจุบันได้มีการนำพลาสติกมาใช้ในงานด้านต่างๆมากมาย พลาสติกสังเคราะห์มีความทนทานและไม่ย่อยสลายจึงเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม ถ้ามีการนำพลาสติกที่ย่อยสลายทางชีวภาพมาใช้ทดแทนได้ จะช่วยลดปัญหาในการกำจัดของเสียประเภทพลาสติกได้ ผลิตภัณฑ์พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีหลายชนิด แต่ชนิดที่ได้รับความสนใจคือ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เนื่องจาก PHA เป็นพอลิเมอร์ประเภทเทอร์โมพลาสติก ซึ่งมีสมบัติใกล้เคียงกับ PE PP และ PVC แต่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ในดิน ในน้ำ และในกองขยะ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (และมีเทนภายใต้สภาวะไร้อากาศ) (Lee, 1996a ; Brandl และคณะ,1990) PHA เป็นพอลิเมอร์ที่สร้างและสะสมอยู่ภายในแกรนูลในเซลล์ของจุลินทรีย์เซลล์เดียวบางกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารและเป็นแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ ชนิดของ PHA ที่ถูกสังเคราะห์และสะสมจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งสารคาร์บอน และภาวะที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ PHA มีอยู่หลายชนิด เช่น พอลิ (3-ไฮ ดรอกซีบิวทิเรต) ซึ่งเป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) เพียงชนิดเดียว ส่วนโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ชนิดร่วมกัน ได้แก่ พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) และพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-4HB)] เป็นต้น การผลิต P(3HB-co-3HV) ในภาคอุตสาหกรรมได้มีการพัฒนาขึ้นโดย ZENECA Bioproducts ซึ่งเป็นบริษัทในเครือ ICI ประเทศอังกฤษ และเปลี่ยนกิจการเป็นของบริษัท Monsanto ประเทศสหรัฐอเมริกา และได้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้ชื่อว่า "Biopol^{TM}" ซึ่งผลิตจาก *Alcaligenes eutrophus* H16 ซึ่งโคพอลิเมอร์นี้มีสมบัติดีกว่า PHB (Anderson และ Dawes, 1990 ; Lee, 1996b)

P(3HB-co-3HV) มีสมบัติที่ดีกว่า PHB เนื่องจากมีโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) เป็นองค์ประกอบ โดยมีรายงานว่าการมี 3HV ในสายพอลิเมอร์มีผลให้ระดับความ

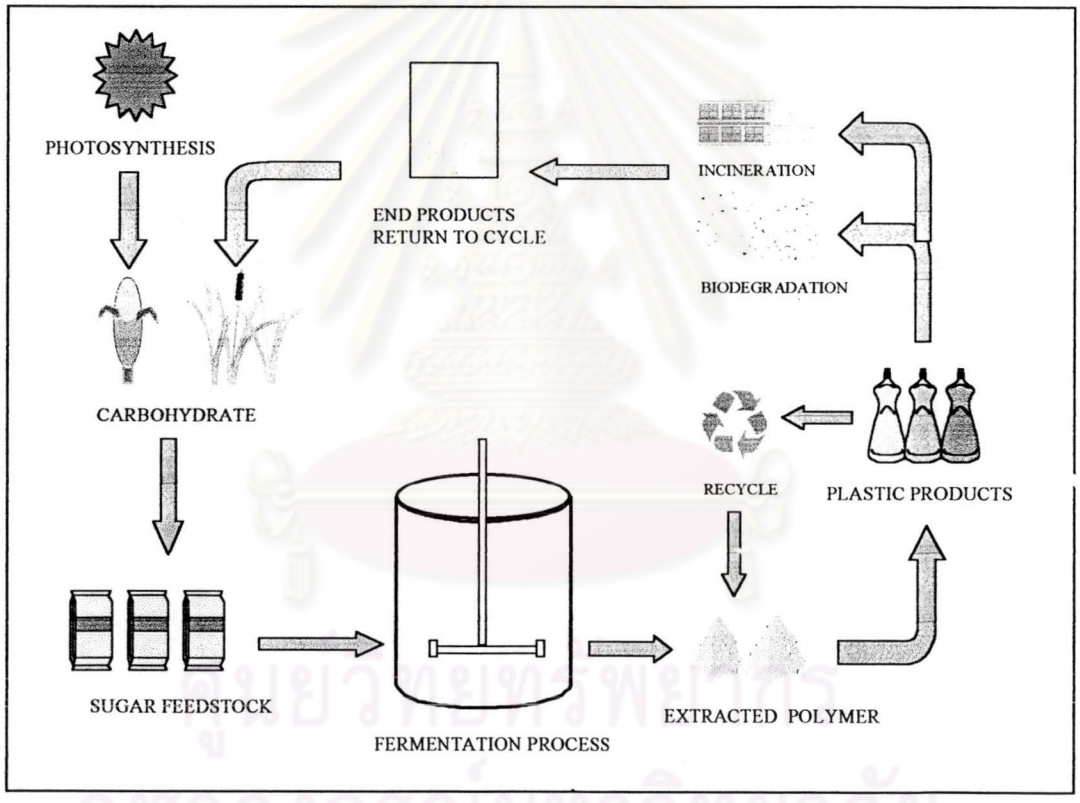
เป็นผลึก (degree of crystallinity) อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (T_g) และอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ลดลง ส่งผลต่อสมบัติเชิงกลทำให้ความแข็งลดลงและมีความเหนียวเพิ่มขึ้น (Bloembergen และคณะ, 1986; เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์, 2542) P(3HB-co-3HV) ซึ่งมีสัดส่วนของ 3HV ที่เหมาะสม ซึ่งทำให้มีสมบัติการยืดหยุ่นดีกว่า PHB ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ เช่น "Biopol™" ซึ่งผลิตขึ้นเป็น P(3HB-co-3HV) ที่มีสัดส่วนของ 3HV อยู่ในช่วง 0-30 โมลเปอร์เซนต์ (Nobes, 1994)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ทดแทนพลาสติกบางชนิดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน PHA เป็นพอลิเมอร์ประเภทเทอร์โมพอลิเอสเทอร์ มีสมบัติคล้ายกับ PE PP และ PVC ซึ่งเป็นพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีที่ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ส่วนใหญ่ในปัจจุบัน มีสมบัติที่ใกล้เคียงกัน เช่น จุดหลอมเหลว ระดับความเป็นผลึก การต้านแรงดึง และน้ำหนัก (Brandl และคณะ,1990) PHA สามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ในดิน น้ำจืด น้ำกร่อย น้ำทะเล ตะกอนน้ำทะเล และน้ำเสีย รวมทั้งในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยกลุ่มของแบคทีเรีย รา สาหร่าย และสเตรปโตมัยซีสจำนวนมากที่เกาะอยู่บนผิวพอลิเมอร์แล้วปล่อยเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (depolymerase) ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยพอลิเมอร์ให้เป็นหน่วยโมโนเมอร์ จากนั้นโมโนเมอร์จะถูกดูดซึมผ่านเข้าทางผนังเซลล์ เกิดปฏิกิริยาการเมตาบอไลซ์เปลี่ยนเป็นสารที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์พร้อมทั้งปล่อยน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาในภาวะที่มีออกซิเจน หรือปล่อยก๊าซมีเทนออกมาภายใต้ภาวะไร้อากาศได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการย่อยสลาย (Lee, 1996a; Cox, 1994) PHA มีโครงสร้างย่อยที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์หลายชนิด สามารถปรับสัดส่วนของโมโนเมอร์แต่ละชนิดเพื่อให้มีสมบัติเหมาะสมตามต้องการ ทั้งยังไม่เป็นพิษและสามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต (biocompatability) นอกจากนี้วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA เป็นวัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งเป็นทรัพยากรที่ผลิตทดแทนใหม่ได้ (renewable resource) ในขณะที่พลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีทั่วไปใช้วัตถุดิบที่ใช้แล้วหมดไปไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

วัฏจักรของ PHA

ประเด็นที่น่าสนใจในการนำ PHA มาใช้แทนพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี คือ PHA เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพและผลิตได้จากกระบวนการหมักที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนซึ่งส่วนใหญ่มาจากทรัพยากรที่ผลิตทดแทนใหม่ได้ เช่น น้ำตาลอ้อย ข้าวโพด หรือวัตถุดิบจากการเกษตรอื่น จึงทำให้การผลิตและการย่อยสลาย PHA เป็นวัฏจักรที่แตกต่างจากพลาสติกทั่วไปที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งไม่ถูกย่อยสลายและใช้วัตถุดิบประเภทฟอสซิล (fossil) ที่มีวันหมดลงได้ (Luizer, 1992; William และ Peoples อ้างถึงใน Madison และ Huisman, 1999)



รูปที่ 1 วัฏจักรของ PHA (Luzier, 1992)

วัฏจักรของ PHA ดังแสดงในรูปที่ 1 เริ่มจากการผลิต PHA ซึ่งใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก โดยจุลินทรีย์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารคาร์บอนโดยอาศัยกระบวนการเมตาบอลิสมของจุลินทรีย์ แล้วสะสมพอลิเมอร์ PHA ในรูปของแกรนูลอยู่ภายในเซลล์ เมื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกต่างๆแล้ว ภายหลังการใช้งาน PHA จะถูกจัดการได้เช่นเดียวกับพลาสติกโดยทั่วไป โดยเมื่อเกิดการสลายตัวบางส่วนจะได้เป็นปุ๋ยที่มีแหล่ง

คาร์บอนอินทรีย์ที่อุดมสมบูรณ์ ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำ รักษาปริมาณสารอาหารในดิน และสามารถยับยั้งการเกิดโรคพืชบางชนิด เมื่อย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ พืชสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์แสง เพื่อการเจริญเติบโตและสามารถนำกลับไปใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเพื่อผลิต PHA อย่างเป็นวัฏจักรต่อเนื่อง (Luzier, 1992; Narayan, 1994; Lee, 1996a)

การค้นพบและการวิเคราะห์ PHA

PHA ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1888 โดย Beijerink (อ้างถึงใน Braunegg, 1998) จากการสังเกตเห็นแกรนูล (granule) ซึ่งมีลักษณะเป็นรีแฟรกไทล์บอดี (refractile bodies) ในแบคทีเรีย และในปี คศ. 1925 Lemoigne (อ้างถึงใน Doi, 1990) ได้วิเคราะห์ PHB ครั้งแรกในระหว่างการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) จาก *Bacillus megaterium* ด้วยวิธีการวิเคราะห์โดยน้ำหนักที่ละลายในคลอโรฟอร์มร้อน ต่อมา Williamson และ Wilkinson ในปี 1958 ได้ปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ให้มีความไว (sensitivity) มากขึ้นและย้อมสีแกรนูลของ PHA ด้วยซูดานแบล็ก บี (Sudan black B) จนกระทั่งในปี 1960 Slepecky และ Law ได้ใช้กรดซัลฟูริกและความร้อนย่อย PHB ได้กรดโครโตนิก แล้ววิเคราะห์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ในปี คศ.1974 มีรายงานของ Wallen และ Rohwedder (อ้างถึงใน Doi, 1990) ว่าได้พบหน่วยโมโนเมอร์อื่นๆ นอกจาก 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เช่น 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต 3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต (3-hydroxyhexanoate หรือ 3HHx) และ 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต (3-hydroxyoctanoate หรือ 3HO) นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาเพื่อหาวิธีวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งBraunegg และคณะ (1978) ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟฟีเป็นครั้งแรก ต่อมาComeau และคณะ (1988) ได้ทำการศึกษาปรับปรุงวิธีการโครมาโตกราฟฟีให้ดียิ่งขึ้น

ชนิดของจุลินทรีย์ที่สะสม PHA

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตและสะสม PHA ได้มีหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ราและยีสต์ ดังตารางที่ 1

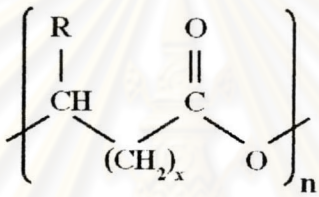
ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สะสมPHA (Doi, 1990; Hassan และคณะ, 1996; Son และคณะ, 1996; Zuzuki และคณะ, 1996)

Acidovorax	*Gamphosphaeria*	*Photobacterium*
Acinetobacter	*Haemophilus*	*Pseudomonas*
Actinobacillus	*Halobacterium*	*Rhizobium*
Actinomycetes	*Hydrogenophaga*	*Rhodobacter*
Alcaligenes	*Hyphomicrobium*	*Rhodococcus*
Aphanothece	*Lamprocystis*	*Rhodospirillum*
Aquaspirillum	*Lampropedia*	*Sphaerotilus*
Azotobacter	*Leptothrix*	*Spirillum*
Bacillus	*Methylobacterium*	*Spirulina*
Beggiatoa	*Methylocystis*	*Streptomyces*
Beijerinckia	*Methylosinus*	*Synechococcus*
Burkladeria	*Micrococcus*	*Syntrophomonas*
Caulobacter	*Microcoleus*	*Thiobacillus*
Chlorofrexeus	*Microcystis*	*Thiocapsa*
Chlorogloea	*Moraxella*	*Thiocystis*
Chromatium	*Mycoplana*	*Thiodictyon*
Chromobacterium	*Nitrobacter*	*Thiopedia*
Clostridium	*Nitrococcus*	*Thiosphaera*
Derxia	*Nocardia*	*Vibrio*
Ectothiorhodospira	*Oceanospirillum*	*Xanthobacter*
Escherichia	*Paracoccus*	*Zoogloea*
Ferrobacillus	*Paucispirillum*	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงสร้างของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวแรกกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวถัดไปตรงตำแหน่งบีตาคาร์บอน ซึ่งเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) ที่แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration การต่อเชื่อมกันของแต่ละโมโนเมอร์เป็นแบบหางต่อหัวที่มีหมู่อัลคิล [R] ต่ออยู่ด้านเดียวกันของสายโซ่คาร์บอนอย่างสม่ำเสมอจึงมีความสม่ำเสมอทางด้านเคมีสเตอริโอของหน่วยซ้ำ(isotactic) คล้ายกับพอลิโพรพิลีน (Byrom, 1987) ดังรูปที่ 2 นอกจากพอลิเอสเทอร์สายตรงแล้วอาจมีโครงสร้างเป็นแบบพันธะคู่ แบบอะโรมาติก (aromatic) หรือแบบฮาโลจิเนต(halogenated) ได้ (Madison และ Huisman,1999)



เมื่อ x = 1 R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต) ; P(3HP)

R = เมทธิล (CH_3) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ; P(3HB)

R = เอทธิล (C_2H_5) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ; P(3HV)

R = โพรพิล (C_3H_7) สารนี้คือ พอจิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) ; P(3HC)

R = บิวทิล (C_4H_9) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต) ; P(3HH)

R = เพนทิล (C_5H_{11}) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) ; P(3HO)

R = เฮกซิล (C_6H_{13}) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต) ; P(3HN)

R = เฮปทิล (C_7H_{15}) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดกคาโนเอต) ; P(3HD)

R = ออกทิล (C_8H_{17}) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีอันเดกคาโนเอต) ; P(3HUD)

R = โนนิล (C_9H_{19}) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดกคาโนเอต) ; P(3HDD)

เมื่อ x = 2 R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ; P(4HB)

เมื่อ x = 3 R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ; P(5HV)

~ คือพันธะเอสเทอร์

* คือตำแหน่งบีตาคาร์บอน

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ PHA (Lee, 1996a; Lee, 1996b; Doi, 1990)

หน้าที่และบทบาทของ PHA ภายในเซลล์

PHA เป็นสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับการให้พลังงานภายในเซลล์ เช่นเดียวกับไกลโคเจนที่สะสมในสัตว์ชั้นสูง หรือแป้งที่สะสมในพืช โดยทั่วไปจุลินทรีย์มีการสะสมพลังงานภายในเซลล์อยู่ 3 รูปแบบ คือ PHA ไกลโคเจน หรือพอลิฟอสเฟต ซึ่งPHA เป็นชนิดเดียวที่ไม่ได้ให้พลังงานในรูปเอทีพี (ATP) โดยตรง แต่มีบทบาทดังนี้ (Dawes และ Senior, 1973)

- ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งพลังงานระหว่างภาวะขาดแคลนอาหารเพื่อใช้ในการดำรงชีพ ช่วยการควบคุมแรงดันออสโมติก รักษาระดับ pH ภายในเซลล์ ช่วยในการเคลื่อนที่ของโปรตีนกับกรดนิวคลีอิก ทำให้เกิดการย่อยสลายตัวเอง และการตายในภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจนเกิดช้าลง ซึ่งพบใน *Bacillus megaterium* (Macrae และ Wilkinson, 1958) นอกจากนี้ยังช่วยให้แบคทีเรียในช่วงที่มีการเจริญคงที่(stationary phase) มีความทนทานได้มากขึ้น เช่น ทนต่อความเย็นทันที (cold shock) ร้อนทันที (heat shock) และทนต่อความแห้ง (Postgate และ Hunter, 1962 อ้างถึงใน Dawes และ Senior, 1973) เป็นต้น

- ใช้ในการสร้างสปอร์ในสายพันธุ์ของ *Bacillus* และซีสต์ของ *Azotobacter* เพื่อเป็นกลไกพิเศษสำหรับช่วยให้มีชีวิตอยู่ได้ภายใต้ภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะเมื่อมีการขาดแคลนสารอาหาร (Dawes และ Senior, 1973)

- ใช้เป็นแหล่งอิเลคตรอนใน Azotobacteriaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ โดยการสังเคราะห์ PHB แทนกระบวนการหายใจสำหรับออกซิเดชั่น NAD(P)H อีกครั้ง (Dawes และ Senior, 1973)

การจำแนกชนิดของ PHA

การจำแนกชนิดของ PHA สามารถแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA ออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1) โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

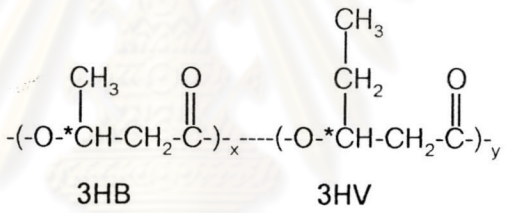
2) เฮเทอร์โรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือพอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต-โค-3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) [Poly (3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyocta noate) หรือ P(3HH-co-3HO)] เป็นต้น

- เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-3HV-co-4HB)] เป็นต้น

โคพอลิเมอร์พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของ P(3HB-co-3HV) (Hammond และ Liggat, 1995)

P(3HB-co-3HV) เป็นโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3HB ต่อเชื่อมกับ 3HV ด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกกับหมู่ไฮดรอกซี โดยมีการเรียงตัวของโมโนเมอร์เป็นแบบสุ่ม แสดงลักษณะเป็นไอโซไดมอร์ฟิซึม (isodimorphism) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์สองชนิดที่คล้ายกันจึงสร้างผลึกร่วมกัน (cocrystallization) ได้ (Bluhm และคณะ, 1986) ดังรูปที่ 3 นับตั้งแต่มีการค้นพบโคพอลิเมอร์ ได้มีการศึกษาสมบัติต่าง ๆ พบว่า P(3HB-CO-3HV) มีสมบัติที่ดีกว่า PHB ทั้งสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมี (Bloembergen และคณะ, 1986 และ Doi และคณะ, 1995)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบสมบัติของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ(Holmes, 1988; Lee, 1996; Doi, 1990)

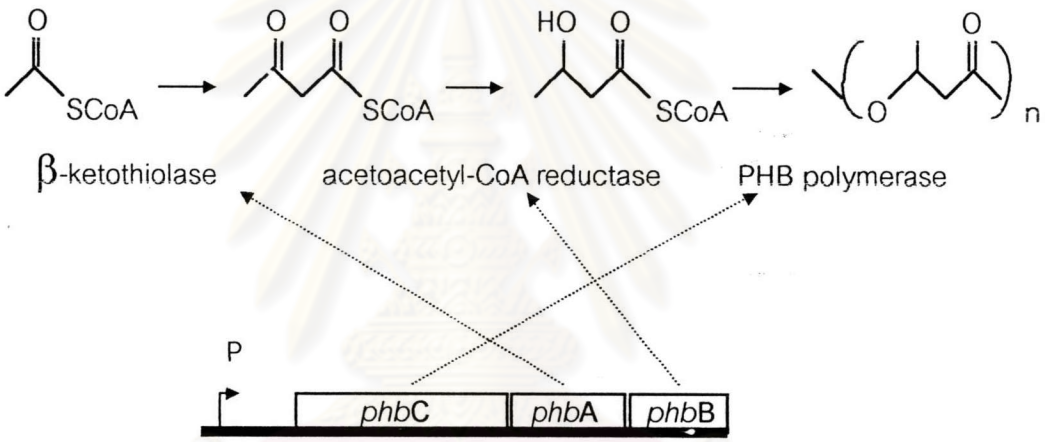
ชนิดของพอลิเมอร์	อุณหภูมิหลอมเหลว (^{0}ซ)	โมดูลัสของยังส์ (GPA)	เปอร์เซ็นต์การยืดตัว (%)
P(3HB)	179	3.5	5
P(3HB-co-3HV)			
3 mol% 3HV	170	2.9	-[a]
9 mol% 3HV	162	1.9	-
14 mol% 3HV	150	1.5	-
20 mol% 3HV	145	1.2	-
25 mol% 3HV	137	0.7	-
34 mol% 3HV	97	-	970
55 mol% 3HV	77	-	1200
71 mol% 3HV	83	-	5
Polypropylene (PP)	170	1.7	400
Polyethylene-Terephthalate (PET)	262	2.2	7300
Polystyrene (PS)	110	3.1	-

หมายเหตุ [a] ไม่มีข้อมูล

วิถีการสังเคราะห์ PHA

มีการศึกษาวิถีการสังเคราะห์ PHB ในปี 1973 โดยนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม คือ Dawes และ Senior (1973) กับ Oeding และ Schlegel (1973) ได้สรุปว่า อะเซติลโคเอ (acetyl CoA) เป็นสารตั้งต้นของวิถีการสังเคราะห์ PHB และศึกษาถึงความเกี่ยวข้องกับสารมัธยันตร์ของวัฏจักรทีซีเอ (TCA cycle) และรายงานว่าการที่อะเซติลโคเอจะถูกออกซิไดซ์เข้าสู่วัฏจักรทีซีเอหรือเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์PHB นั้นขึ้นอยู่กับภาวะแวดล้อมภายนอก กล่าวคือเมื่อมีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและมีการจำกัดปริมาณธาตุบางอย่าง ได้แก่ ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟต แมกนีเซียม ฟอสเฟต โพแตสเซียม และเหล็ก (Steinbuchel และ Schelegel, 1989 อ้างถึงใน Braunegg และคณะ, 1998) ซึ่งใน *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha* เสนอโดย

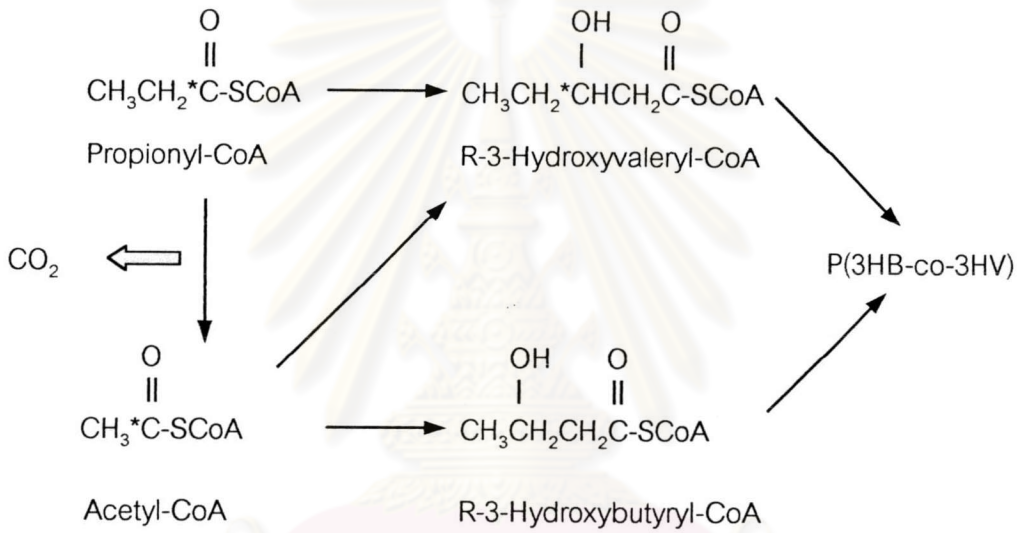
Osterhout และคณะ, 1998) มีการควบคุมเป็นแบบโอเปอรอนเดี่ยว (single operon) ที่ประกอบด้วยยีนส์โครงสร้าง (structural genes) คือ *phbC phbA phbB* ซึ่งแต่ละยีนส์ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์พีเอชบี พอลิเมอเรส หรือ พีเอชบี ซินเทส (PHB polymerase or PHB synthase) บีตา-คีโตไธโอเลส หรือ3-คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase or 3-ketothiolase) และอะเซโตอะเซติลโคเอรีดักเทส (acetoacetyl-CoA reductase) ตามลำดับ ดังรูปที่ 4 โดยวิถีการสังเคราะห์ PHB เริ่มต้นด้วยอะเซติลโคเอสองโมเลกุลรวมกันโดยเอนไซม์บีตาคีโตไธโอเลสกลายเป็นอะเซโตอะเซติลโคเอ จากนั้นอะเซโตอะเซติลโคเอจะถูกรีดิวซ์เป็นดี3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA) โดยเอนไซม์อะเซโตอะเซติลโคเอรีดักเทส ต่อจากนั้นดี3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอก็ถูกพอลิเมอร์ไรซ์(polymerize) โดยเอนไซม์พีเอชบี พอลิเมอเรส ได้เป็น PHB



รูปที่ 4 วิถีการสังเคราะห์PHB (Madison และ Huisman, 1999)

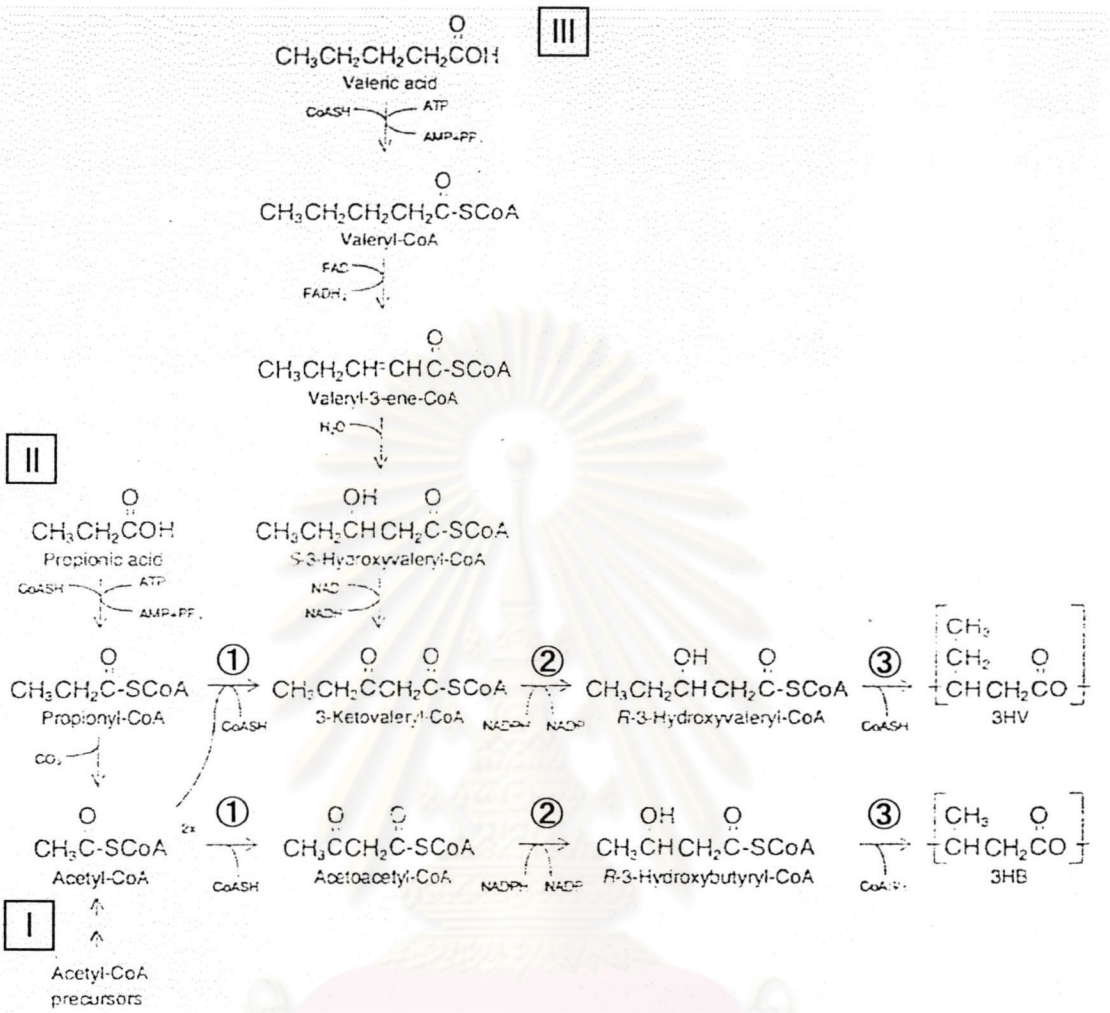
การควบคุมเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ PHB คือ บีตาคีโตไธโอเลสเพราะจะถูกยับยั้งด้วยโคเออิสระที่มีปริมาณสูงที่ได้จากอะเซทิลโคเอปล่อยออกมาหลังจากเข้าสู่วัฏจักรทีซีเอ ภายใต้ภาวะที่มีการจำกัดสารตั้งต้นบางชนิดเอนไซม์ซิเตรตซินเทส (citrate synthase) จะถูกยับยั้งโดยเอ็นเอดีเอช (NADH) ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น จึงลดความเข้มข้นของโคเอ แต่วิถีการสังเคราะห์บางส่วนที่แตกต่างไป เช่น สารตั้งต้นที่เป็นบิวทิเรตหรือกรดไขมันไม่ต้องการบีตาคีโตไธโอเลส (Doi และคณะ, 1992)

วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-CO-3HV) ได้มีการศึกาวิธีการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ชนิดนี้ใน *Alcaligenes eutrophus* โดยการใช้โซเดียมโพรพิโอเนตเพียงอย่างเดียว ในวิถีการสังเคราะห์จากคาร์บอนอะตอมที่มีการติดฉลากกัมมันตรังสี (*C) พบว่าโพรพิโอเนตถูกเปลี่ยนเป็นโพรพิโอนิลโคเอ (propionyl-CoA) ซึ่งโพรพิโอนิลโคเอสามารถถูกเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคเอได้โดยปล่อยคาร์บอนในหมู่คาร์บอนิลออกมา ดังนั้น 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) ที่ได้ มาจากปฏิกิริยาระหว่างโพรพิโอนิลโคเอร่วมกับอะเซติลโคเอ และได้3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) จากการรวมตัวกันของอะเซติลโคเอสองโมเลกุล (Doi, 1987a) ดังวิถีการสังเคราะห์รูปที่ 5



รูปที่ 5 วิถีการสังเคราะห์ของโคพอลิเอสเทอร์ ที่ประกอบด้วยหน่วยของ3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) (Doi และคณะ, 1987a)

Braunegg และคณะ (1998) ได้สรุปวิถีการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ PHA ชนิดต่างๆ คือ 3HB และ 3HV ดังแสดงในวิถีการสังเคราะห์รูปที่ 6 จากสารตั้งต้นได้หลายชนิด ซึ่งวิถีการสังเคราะห์ที่ I ได้ PHB จากอะเซทิลโคเอ และวิถีที่ II ได้ P(3HB-co-3HV) จากกรดโพรพิโอนิก ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น วิถีที่ III การใช้กรดวาเลอริกเป็นสารตั้งต้น พบว่าสามารถใช้วาเลอริกเป็นสารตั้งต้นสำหรับ 3-ไฮดรอกซีวาเลอริลโคเอ โดยพอลิเมอร์ไรซ์ (polymerize) เป็นพอลิเมอร์ผ่านทางวาเลอริลโคเอ (valeryl-CoA) แล้วเข้าบีตาออกซิเดชัน ซึ่งพบว่า *Ralstonia eutropha* และ *Alcaligenes latus* จะผลิตได้ 3HV สูงกว่าการใช้โพรพิโอนิก



รูปที่ 6 วิถีการสังเคราะห์ PHA ใน *Ralstonia eutropha* เอนไซม์: ① β-ketothiolase; ② NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; ③ PHB synthase (Oeding และ Schlegel; Doi และคณะ; Kunioka และคณะ; Doi; Nakamura; Akiyama และ Doi; Shi และคณะ, อ้างถึงใน Braunegg และคณะ, 1998)

นอกจากนั้น Page และคณะ (1997) ได้ศึกษาการผลิต P(3HB-CO-3HV) จากแหล่งคาร์บอนที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ โดย *Azotobacter salinestris* พบว่าสารตั้งต้นแต่ละชนิดเลือกเข้าวิถีในการสังเคราะห์ 3HV ทั้งการนำโพรพิโอเนตไปเปลี่ยนได้โดยตรง หรือผ่านทางบีตาออกซิเดชั่นเพียงบางส่วนของวาเลอเรต ส่วนใน *Bacillus* ถึงแม้ว่า *Bacillus megaterium* เป็นสายพันธุ์แรกที่ถูกแยกและมีรายงานว่าสามารถสะสม PHB ได้ก็ตาม แต่วิถีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ใน *Bacillus* นั้นยังไม่สามารถจัดประเภทได้แน่นอน (Braunegg และคณะ, 1998)

การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในแบคทีเรียส่วนใหญ่สังเคราะห์ PHA และสะสมไว้ภายในเซลล์ภายใต้ภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น จำกัดไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือออกซิเจน และให้แหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ ซึ่งเป็นปัจจัยต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงที่กระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิต PHA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นที่รู้กันว่าแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Alcaligenes latus* และ *Azotobacter venilandii* สายพันธุ์กลายจะสะสม PHA ระหว่างการเจริญในช่วงที่สารอาหารจำกัด การผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมควรจะคำนึงถึงการเลือกจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญ และมีปัจจัยหลายด้านรวมถึงความสามารถของเซลล์ในการใช้แหล่งคาร์บอนที่ราคาไม่แพง อัตราการเจริญ อัตราการสังเคราะห์และสะสมพอลิเมอร์ การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนเป็นสารตั้งต้นสำคัญไม่ควรจะได้ของเสียอื่นควรได้แต่ PHA (Lee, 1996b)

PHA มีอยู่หลายประเภท แต่มีเพียง 3 ประเภท ที่ผลิตให้ได้ความเข้มข้นสูง ได้แก่ Poly(3-hydroxybutyrate) Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) และ Poly(3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate) ขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์ สารตั้งต้น และภาวะการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ต่างกัน(Lee, 1996b)

ในระดับอุตสาหกรรมมีความสนใจในการผลิตโคพอลิเมอร์มากกว่า PHA ชนิดอื่นโดยเฉพาะ P(3HB-co-3HV) เนื่องจากสามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติ มีสมบัติหลายประการใกล้เคียงกับพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี และเป็นสารที่สามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต โดยไม่มีการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย จึงมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมโดยที่บริษัท ZENECA Bioproducts เป็นบริษัทแรกที่ผลิตผลิตภัณฑ์จาก PHA ออกมาในรูปของ PHB และ P(3HB-co-3HV) จาก *A. eutrophus* ซึ่งมีชื่อการค้าว่า BIOPOL™ โดยมีกำลังการผลิตต่อปีถึง 1,000 ตัน และได้ทำการผลิตตามจำนวนการสั่งสินค้าในปลายปี 1990 หลายพันตัน มีการนำวัสดุ BIOPOL มาผลิตเป็นขวดแชมพูโดยบริษัท German hair-care company, Wella และยังมีผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่ทำขึ้นจาก BIOPOL เช่น ด้ามมีดโกนที่ใช้แล้วทิ้ง ถาดสำหรับใส่อาหาร ซึ่งมีขายในประเทศญี่ปุ่น มีการคาดการว่าภายในปี 2000 ความต้องการพลาสติกที่สามารถย่อยสลายเองได้ในธรรมชาติจะมีสูงถึง 1.4 ล้านตันต่อปี (Lee, 1996b) ซึ่งจะเป็นการคิดแก้ปัญหาขยะที่เกิดจากพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีได้ทางหนึ่ง

ปัญหาในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม คือ มีต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากสารตั้งต้นมีราคาแพง มีอัตราการผลิตต่ำ ขั้นตอนในการสกัด และการทำให้บริสุทธิ์ มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง (Eggink และคณะ, 1992) การพัฒนาการผลิตให้ได้ PHA ปริมาณที่สูงขึ้น ปัจจัยคือ อัตราการผลิตสูง(high productivity) และได้ผลผลิตสูง (high yield) และความหนาแน่นของเซลล์จุลินทรีย์ที่สูง (high cell density) เป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อลดต้นทุนทั้งหมด (Yamane และคณะ, 1996)

ความสำคัญของการวิจัยและพัฒนาการผลิตให้ได้ PHA ปริมาณเพิ่มขึ้น คือ สามารถที่จะผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ปริมาณสูง ลดปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือขนาดของถังหมักให้เล็กลง ทำให้ขั้นตอนภายหลังกระบวนการหมักง่ายขึ้น รวมทั้งลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักด้วย วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณเซลล์สูง Suzuki และคณะ (1986) ศึกษาการเลี้ยง *Protomonas extorquens* ในอาหารที่มีเมทธานอลเพื่อการผลิต PHB พบว่าเมื่อมีการเติมสารอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณน้อยๆ เพื่อคงรักษากิจกรรมของเซลล์ในการผลิต PHB มีผลทำให้อัตราผลผลิตสูงขึ้น เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการหมักลดลงจาก 175 ชั่วโมงเป็น 121 ชั่วโมง Lee และ Chang (1993) ศึกษาการเจริญของ recombinant *E. coli* W ในอาหาร R medium ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน การเลี้ยงเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสามารถใช้กลวิธีการเติมอาหารแบบง่าย คือ ทำการเติมอาหาร (ซูโครส และ $MgSO_4.7H_2O$) เมื่อความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นวิธีการเลี้ยงแบบ pH-stat fed-batch พบว่าได้เซลล์ของ recombinant *E. coli* W เท่ากับ 124.6 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้น PHB เท่ากับ 34.3 กรัมต่อลิตรที่ 48 ชั่วโมง Yamane และคณะ (1996) ศึกษาการเจริญของ *Alcaligenes latus* โดยเลี้ยงเชื้อแบบ pH-stat fed-batch ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถเพิ่มอัตราผลผลิตของ PHB เนื่องจากเซลล์ที่ได้มีความเข้มข้นสูงและใช้ระยะเวลาเลี้ยงสั้น เป็นผลจากการใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นสูง ได้ความเข้มข้นเซลล์142 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น PHB เท่ากับ 68.4 กรัมต่อลิตรในเวลา 18 ชั่วโมง

กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักแบบแบช (Batch culture)

เป็นกระบวนการหมักที่ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ภายในระบบปิด การเลี้ยงเชื้อนิยมทำในขวดเขย่าหรือในถังหมัก โดยใช้สารอาหารและภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโต สารอาหารที่ใช้ในระบบมีปริมาณจำกัด เพราะไม่มีการเติมสารอาหาร ภาวะภายในระบบมีการเปลี่ยนแปลง สารอาหารถูกใช้หมดไป ความเป็นกรดด่างเปลี่ยนไป มีการสะสมสารพิษ เป็นต้น รูปแบบการเจริญสามารถแบ่งออกเป็นระยะต่างๆดังนี้ (Aiba และคณะ, 1973; Scragg, 1991)

1) ระยะการพักตัว (lag phase) หลังจากการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ ระยะนี้จะไม่ค่อยเห็นการเปลี่ยนแปลงของการเจริญช่วงของระยะการพักตัว ขึ้นอยู่กับเชื้อว่ามีความสามารถมากหรือน้อยที่จะปรับตัวเมื่อเจริญในสิ่งแวดล้อมใหม่ และเริ่มสังเคราะห์สารที่จำเป็น เช่น สารพันธุกรรม โปรตีนต่างๆโดยเฉพาะเอนไซม์สำหรับใช้ในการเจริญ และสังเคราะห์สารใหม่ๆเพื่อใช้ในการเจริญ ดังนั้นถ้าอาหารและสิ่งแวดล้อมมีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์ ช่วงเวลาการพักตัวก็จะสั้นหรือไม่มีเลย ช่วงนี้อาจยาวนานถ้าส่วนประกอบของอาหารแตกต่างจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกล้าเชื้อมาก

2) ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential หรือ log phase) หลังจากระยะการพักตัวแล้วอัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเริ่มคงที่ ภายใต้ภาวะนี้การสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์เพิ่มขึ้นด้วยอัตราคงที่ ดังนั้นจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณและต่อเนื่องอยู่ช่วงหนึ่ง แม้ว่าจะเป็นช่วงของการเจริญที่สมดุลย์ แต่สิ่งแวดล้อมของเซลล์ก็มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน เนื่องจากมีการใช้สารอาหารและการสะสมสารผลิตภัณฑ์

3) ระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) เป็นช่วงท้ายสุดของการเจริญแบบทวีคูณ อัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งถึงศูนย์ ในระยะการเจริญแบบคงที่นี้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่และไม่มีการเจริญ การเจริญอาจมีบ้างแต่จะมีเท่ากับการตายของเซลล์ ดังนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งจึงสมดุลย์กัน เหตุที่เซลล์หยุดการเจริญเพราะว่าสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญหมดลง การสะสมสารพิษมีมากขึ้น เหตุที่เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ได้เนื่องจากมีการใช้สารที่เก็บสะสมภายในเซลล์เป็นแหล่งอาหาร หรืออาจใช้พัฒนาต่อไปเพื่อให้ทนต่อความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมได้ ในช่วงการเจริญแบบคงที่อาจตามด้วยระยะการตาย (decline phase) ซึ่งอัตราการตายเพิ่มมากกว่าอัตราการเจริญ

การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) เมื่อเทียบกับปริมาณเซลล์เริ่มต้นในช่วงการเจริญแบบทวีคูณของจุลินทรีย์น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าทำให้ได้ความสัมพันธ์ดังนี้ (Scragg, 1991)

$$n = t / t_d \qquad (1)$$

เมื่อ

n = จำนวนการเพิ่มเป็นสองเท่า (number of doublings)

t = เวลา (ชั่วโมง)

t_d = เวลาที่ใช้เพิ่มจำนวน (ชั่วโมง)

ชีวมวลที่เกิดขึ้นหลังจากเวลา t คือ

$$X_t = X_0 2^n = X_0 2^{t/td} \qquad (2)$$

ใส่ natural logarithm ในสมการ (2)

$$\ln (X_t / X_0) = \ln 2 \, . \, t / t_d \qquad (3)$$

เมื่อ

X_t = ความเข้มข้นของชีวมวล ณ เวลา t (กรัมต่อลิตร)

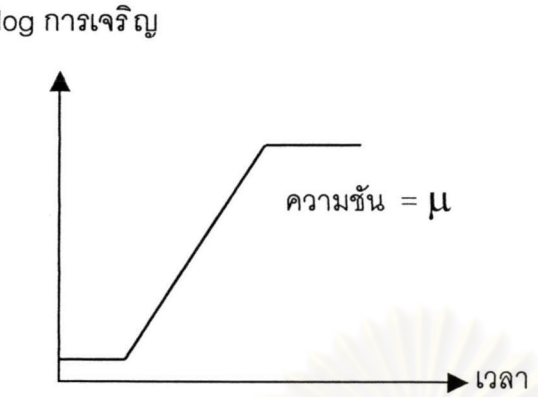
X_0 = ความเข้มข้นของชีวมวลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

ทำการจัดสมการ (3) ใหม่

$$\frac{\ln X_t - \ln X_0}{t} = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0.693}{t_d} = \mu \qquad (4)$$

ดังนั้นเมื่อทำการเขียนกราฟระหว่าง $\ln (X_t - X_0)$ กับเวลาที่ใช้เลี้ยง ความชันของเส้นกราฟที่ได้จะเท่ากับ $0.693 / t_d$ หรืออัตราการเจริญจำเพาะ(specific growth rate, μ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 กราฟแสดงการหาอัตราการเจริญจำเพาะ(μ)

ถ้าต้องการหาอัตราการเจริญจำเพาะที่เวลาใดๆในช่วงระหว่างการเจริญสามารถหาได้จาก น้ำหนักเซลล์แห้งที่สะสม = เซลล์เจริญ - เซลล์ออก - เซลล์ตาย

$$dX / dt = \mu X - \frac{F}{V} . X - \alpha X \qquad (5)$$

เมื่อ F = อัตราการไหลออกของอาหาร (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรของอาหาร(ลิตร)

α = อัตราการตายจำเพาะ (ชั่วโมง $^{-1}$)

เซลล์ไม่มีการออกจากระบบ และ $\alpha >>> \mu$ สามารถเขียนสมการใหม่คือ

$$\mu = \frac{1}{X} . dX / dt \qquad (6)$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสร้างสารผลิตภัณฑ์

ความสำคัญของผลผลิตชีวมวลต่อสารอาหาร และผลผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร ($Y_{x/s}$ และ $Y_{p/s}$) คือพารามิเตอร์ที่บอกถึงประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารอาหารไปเป็นชีวมวลหรือเป็นสารผลิตภัณฑ์ โดยสามารถอธิบายเป็นชีวมวล หรือมวลของสารผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นต่อสารอาหารที่ใช้ไป ดังนี้

$$dX / dt = -Y_{x/s} . dS / dt \quad (7)$$

และ

$$dP / dt = -Y_{p/s} . dS / dt \quad (8)$$

ค่าผลผลิต (yield) สามารถหาได้โดยการหาปริมาณชีวมวลรวม หรือมวลของสารผลิตภัณฑ์ และสารอาหารที่ใช้ไป

$$Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S \quad (9)$$

$$Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S \quad (10)$$

$$Y_{p/x} = Y_{p/s} / Y_{x/s} = \Delta P / \Delta X \quad (11)$$

กระบวนการหมักแบบเฟดแบช (Fed batch culture)

มีผู้ได้ให้คำจำกัดความของการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชว่าเป็นกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหารที่จำเป็นอย่างต่อเนื่องแล้วหยุด หรือใส่เป็นครั้งคราว และไม่มีการดึงเอาสารผลิตภัณฑ์ออกจากระบบจนกว่าสิ้นสุดการหมัก (Yoshida และคณะ, 1973) วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชเริ่มต้นใช้ในการผลิตยีสต์ตั้งแต่ประมาณปี 1900 สำหรับควบคุมการเจริญของ *Saccharomyces cereviseae* ในการเลี้ยงแบบแบชโดยใช้มอลท์เป็นแหล่งคาร์บอน การผลิตยีสต์นี้มีปัญหาอยู่สองประการคือข้อแรก ถ้าความเข้มข้นของมอลท์สูงเกินไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีเอธานอลเกิดขึ้นแทนการผลิตเป็นชีวมวล ประการที่สองคือถ้าความเข้มข้นของมอลท์ถูกควบคุมให้น้อยที่สุดการเจริญของยีสต์ก็จะถูกจำกัด ปัญหานี้ได้ถูกแก้โดยการหาวิธีควบคุมการเติมอาหารให้พอเหมาะกับการเจริญ (Brown, 1990)

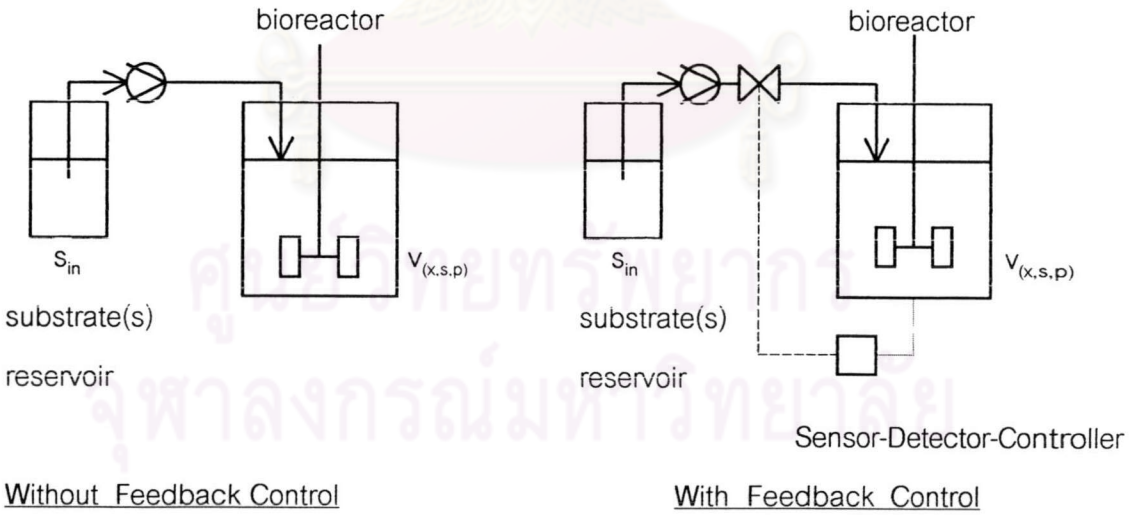
วิธีการควบคุมสำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช

วิธีการที่จะใช้ควบคุมการเลี้ยงแบบเฟดแบชเพื่อง่ายในการใช้งานมีการแบ่งไว้เป็นสองกลุ่มหลัก คือ with feedback control และ without feedback control ดังรูปที่ 8 การเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชจึงอาจมีการเรียกชื่อแตกต่างกันบางครั้งเรียกว่า "semi-batch" ในอังกฤษ ในเยอรมันเรียก"zulaufverfahrem" ในญี่ปุ่นเรียก"ryukaho" (Yamane และ Shimizu, 1984)

การเลี้ยงเชื้อแบบ **with feedback control** แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ (Brown, 1990)

indirect feedback control การควบคุมต้องอาศัยข้อมูล หรือพารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับการหมัก ซึ่งเกี่ยวกับสารตั้งต้น เช่น การละลายของออกซิเจน อัตราส่วนของการหายใจ (เช่น CO_2/O_2) และความเป็นกรดด่าง

direct feedback control เป็นวิธีการติดตามความเข้มข้นสารอาหารในการเลี้ยงเชื้อโดยตรงโดยเฉพาะสารตั้งต้นสามารถรักษาให้คงที่ หรือสามารถแปรผันเพื่อรักษาเข้มข้นให้พอเหมาะ และการควบคุมการเติมอาหารระบบ with feedback control สามารถจัดการให้เป็นระบบเปิด (open-loop system) หรือระบบปิด(closed-loop system)



รูปที่ 8 แผนภาพการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช (Yamane และ Shimizu, 1984)

ในระบบ **without feedback control** การเติมอาหารสามารถเติมด้วยอัตราที่คงที่ เช่น ปรับอัตราการเติมของปั๊ม เติมแบบทวีคูณ (exponential feeding) ให้สัมพันธ์กับการเพิ่มของชีวมวล หรือเติมทุกๆชั่วโมง

ข้อได้เปรียบของวิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบช(Brown, 1990)

1) สามารถใช้สารที่มีผลยับยั้งการเจริญ เช่น เอทธานอล กรดอินทรีย์ สารประกอบอโรมาติกเป็นสารตั้งต้นได้

2) เพิ่มการผลิตชีวมวลได้มากกว่าการเลี้ยงแบบแบช โดยเฉพาะการผลิตที่เป็น growth-associated products สามารถเพิ่มปริมาณได้สูงขึ้นมาก

3) การผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งมีการผลิตไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non growth-related production) เช่น ผลิตสารเมื่อจุลินทรีย์เริ่มเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบคงที่ ในกรณีนี้อัตราการเติมอาหารสามารถควบคุมในช่วงเริ่มต้นให้ผลิตชีวมวลสูง หลังจากนั้นเมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่ช่วงการเจริญแบบคงที่และเจริญช้าลงจัดการเติมอาหารให้เพียงพอสำหรับเป็นพลังงานเพื่อรักษากิจกรรมของเซลล์ไว้ขณะที่การสร้างสารผลิตภัณฑ์กำลังเกิดขึ้น

4) ไม่เกิด catabolite repression

5) ลดความหนืดของอาหาร เช่น การผลิต dextran และ xanthan gum

6) ไม่เกิดปัญหาการปนเปื้อน การกลายพันธุ์ และความไม่คงตัวของพลาสมิด ซึ่งพบในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

ข้อเสียเปรียบของวิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบช(Brown, 1990)

1) เครื่องมือของการเลี้ยงแบบfeedback control มีราคาแพง

2) ในระบบที่เป็น without feedback control การเติมอาหารอาจจะต้องมีการตรวจหารูปแบบของการเจริญไว้ก่อนแล้ว เป็นการยากที่จะคาดถึงการเบี่ยงเบนของรูปแบบการเจริญของเชื้อ เช่น time courses อาจไม่เป็นไปตามรูปแบบที่คาดไว้

3) ต้องการผู้มีทักษะมากสำหรับการปฏิบัติงาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แนวทางการนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

ตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1976 บริษัท Zeneca Bioproducts เริ่มค้นคว้าการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม จากนั้นต้นทศวรรษที่ 80 จึงเริ่มมีการจดสิทธิบัตรการผลิตตลอดกระบวนการผลิตตั้งแต่การสกัดและการผสมกับพอลิเมอร์จินทรีย์ชนิดอื่นๆ จากเชื้อ *Ralstonia eutropha* ซึ่งผลิตภายใต้ชื่อ Biopol™ และต่อมาได้ขายโอนกิจการให้แก่บริษัท Monsanto ประเทศสหรัฐอเมริกา ต่อมาในปี คศ. 1990 บริษัท Wella ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทดูแลเส้นผมของเยอรมนีได้นำมาทำขวดแชมพู และในปี ค.ศ. 1991 และ 1992 มีการนำขวดชนิดนี้มาใช้ประโยชน์และมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกาตามลำดับ จนถึงปี1999 มีกำลังการผลิต 100,000 ตัน ราคากิโลกรัมละ 3.31 เหรียญสหรัฐ (Lee, 1999) นอกจากนั้นยังมีการผลิตในอีกหลายประเทศ เช่น บริษัท Chemie Linz ประเทศออสเตรียได้ผลิต PHB ในเชิงการค้าจาก *Alcaligenes latus* บริษัท Berlin Packing Corp. ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตขวดแชมพู บริษัท Polyfirm Inc.ประเทศแคนาดาได้ผลิตจากไซโลสโดยใช้ *Pseudomonas cepacia* บริษัท Bioscience Ltd. ประเทศฟินด์แลนด์ได้นำมาใช้ทางด้านการแพทย์ (Lee, 1996a) บริษัท Bio Ventures Alberta Inc. ประเทศแคนาดาได้ผลิตจาก recombinant *E. coli* บริษัท Kohap Co. ประเทศเกาหลีก็มีการผลิตเป็นเชิงพาณิชย์ (Chang และคณะ, 1994) ซึ่งการประยุกต์ใช้งานนั้นแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

การประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม (Kimura, 1993; Lee, 1996a)

1) ใช้เป็นวัสดุทางด้านศัลยกรรม เช่น หลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็ม และไหมเย็บแผล เป็นต้น

2) ใช้ทำแคปซูลบรรจุยา เพื่อให้แคบซูลถูกย่อยสลายและค่อย ๆ ปล่อยยาออกมาในปริมาณน้อย ๆ เป็นระยะเวลานาน

3) ใช้ผลิตยาและวิตามิน จากโมโนเมอร์3HB ที่ได้จากการสลายของ PHB

การประยุกต์ใช้ทางด้านเกษตรกรรม

1) ใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มยาฆ่าแมลง ยาปราบวัชพืช หรือปุ๋ย ในหลักการเดียวกับแคปซูลบรรจุยา (Lee, 1996a)

2) ใช้ทำแหจับปลาสำหรับใช้ในน้ำทะเลได้เป็นเวลานาน และสามารถกำจัดเมื่อเลิกใช้โดยทิ้งลงใต้ทะเลได้ (ค่าความถ่วงจำเพาะ 1.25) เนื่องจากสามารถย่อยสลายอย่างรวดเร็ว (Brandl และคณะ, 1995)

การประยุกต์ใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์ หรืออุปกรณ์ใช้สอยอื่น

1) ใช้ผลิตขวดแชมพู ที่ประกอบด้วยส่วนฝาที่ต้องการความแข็งแรงและปิดได้ดี จึงใช้ P(3HB-CO-3HV) ที่มีสัดส่วนของ 3HV ต่ำ ส่วนตัวขวดต้องการ 3HV ในสัดส่วนที่สูงกว่า (เท่ากับ 10 ถึง 20 โมลเปอร์เซ็นต์) เพื่อให้มีความยืดหยุ่นและความเหนียว รวมทั้งไม่มีปฏิกิริยากับแชมพูซึ่งจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ (Cox, 1994)

2) ใช้ทำบรรจุภัณฑ์บรรจุอาหารประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป แผ่นฟิล์มถนอมอาหาร (Doi, 1990; Lee, 1996a)

3) ใช้ทำหมวกนิรภัยสำหรับจักรยาน ซึ่งได้จากการถักเส้นใยของ P(3HB-CO-3HV) ที่มี 3HV เท่ากับ 9 โมลเปอร์เซ็นต์ เพื่อให้มีความแข็งแรง (Brandl และคณะ, 1995)

4) ใช้ทำแผ่นกรองอากาศทำจากแกรนูลของส่วนผสมโซเดียมคลอไรด์ 90 เปอร์เซ็นต์และ P(3HB-CO-3HV) 10 เปอร์เซ็นต์ (ซึ่งมีส่วนผสมของ 3HV 9 โมลเปอร์เซ็นต์) (Brandl และคณะ, 1995)

5) ใช้ทำวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ด้ามมีดโกน เป็นต้น (Cox, 1994; Lee, 1996a)

6) ใช้ทำวัสดุอื่น ๆ เช่น ที่วางลูกกอล์ฟ วัสดุเส้นใย (nonwoven fabrics) กาวที่ละลายด้วยความร้อน สารเคลือบผิว แผ่นฟิล์ม ในบางประเทศนำมาใช้ทำบัตรเครดิต เป็นต้น (Cox, 1994; Lee, 1996a; Madison และ Huisman, 1999)

การประยุกต์ใช้ PHA ในปัจจุบันมักคำนึงถึงลักษณะกลไกและการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เพื่อไม่ให้มีผลต่อสิ่งแวดล้อมภายหลังการใช้งานแล้ว สำหรับการศึกษาในอนาคตได้มีเป้าหมายสำคัญ คือ การประเมินผลกระทบด้านพิษวิทยาต่อระบบนิเวศน์จากการย่อยสลายของวัสดุทางชีวภาพนี้ รวมทั้งการวิเคราะห์วัฏจักรชีวิต (life-cycle) เพื่อจัดการการใช้วัสดุดังกล่าวให้เหมาะสม (Brandl และคณะ, 1995)