บทที่ 1

บทนำ

ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทำให้มนุษย์สามารถสังเคราะห์วัสดุที่มีประโยชน์ คือ พลาสติก มาใช้แทนวัสดุอื่นๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากพลาสติกเป็นวัสดุที่มีน้ำหนักเบา มีความแข็งแรง มีความสวยงามและสามารถปรับแต่งให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ แต่ในขณะที่ความนิยมในการนำพลาสติกมาใช้ในงานต่างๆเพิ่มขึ้น ได้แก่ พลาสติกที่ใช้บรรจุภัณฑ์ และส่วนอุปกรณ์ของเครื่องใช้ต่างๆ ก็ยิ่งจะทำให้ปริมาณขยะเพิ่มมากขึ้น ซึ่งทำให้เกิดปัญหาที่ตามมาคือขยะพลาสติกได้ก่อให้เกิดมลภาวะและเป็นปัญหาที่ทวีความรุนแรงมากขึ้น ไม่เฉพาะในประเทศไทยเท่านั้นทั่วโลกก็เผชิญกับปัญหานี้เช่นกัน พลาสติกเป็นวัสดุสังเคราะห์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วยธาตุสำคัญต่าง ๆ ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจน เมื่อมีการนำพลาสติกมาใช้และกลายเป็นขยะพลาสติกแล้วหากไม่มีการจัดการอย่างถูกวิธีและเหมาะสมก็ทำให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นนักวิชาการด้านสิ่งแวดล้อมและนักวิทยาศาสตร์สาขาต่าง ๆ ได้พยายามคิดค้นวิธีการลดปริมาณขยะ ซึ่งสามารถสรุปแนวทางการกำจัดขยะพลาสติกได้ดังนี้

1. การเผา (incineration) หลายประเทศในยุโรปได้นำพลาสติกใช้แล้วมาเผาเพื่อให้พลังงานในการผลิตกระแสไฟฟ้าหรือการนำมาอบยาสูบ แต่ยังคงสร้างปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถควบคุมควันหรือเขม่าที่เกิดจากการเผาไหม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังรวมถึงก๊าซพิษต่างๆ ที่เกิดขึ้น เช่น ไฮโดรเจนไซยาไนด์ ไฮโดรคลอไรด์ หรือก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีอันตรายจำเป็นต้องมีระบบควบคุมความปลอดภัย และเสียค่าใช้จ่ายสูง (Evans และ Sikdar, 1987 Huffman และคณะ, 1973)

2. การถมที่ (landfilling) เป็นวิธีการกำจัดขยะพลาสติกโดยธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพต่ำและเป็นการแก้ปัญหาในระยะสั้น เนื่องจากปริมาณขยะที่เพิ่มขึ้นจนไม่สามารถหาพื้นที่มารองรับได้หมดในอนาคต (Huffman และคณะ, 1973)

3. การนำกลับมาใช้ใหม่ (recycling) จะมีข้อจำกัดในการใช้งานคือ พลาสติกใช้แล้วมีสิ่งสกปรกตกค้างอยู่ ทำให้พลาสติกที่นำกลับมาใช้ใหม่ต้องใช้กับงานที่ไม่เกี่ยวข้องกับการบริโภคโดยตรง เช่น ถังน้ำ ถุงขยะ กะละมัง เป็นต้น (Evans และ Sikdar, 1987) และขั้นตอนในการแยกขยะพลาสติกชนิดต่างๆ ออกจากกันรวมถึงการแยกสารเติมแต่งออกจากพลาสติกทำได้ยาก เนื่องจากความหลากหลายของชนิดพลาสติกที่ถูกดัดแปลง ทำให้ยากต่อการแยกประเภทของ

พอลิเมอร์เพื่อเข้าสู่กระบวนการนำกลับมาใช้ใหม่ ระบบที่ใช้ในการแยกประเภทที่ใช้ในปัจจุบันในยุโรปคือ การระบุองค์ประกอบของพลาสติกที่ใช้ในแต่ละชนิดเพื่อให้เครื่องคอมพิวเตอร์จำแนกชนิดและติดบาร์โค้ดลงบนผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำให้ง่ายต่อการแยกประเภท (Nicholson, 1994) อย่างไรก็ตามข้อเสียของวิธีการนี้คือพลาสติกที่นำกลับมาใช้ใหม่จะเปลี่ยนแปลงสมบัติของพลาสติกมีผลให้ลักษณะทางเคมีที่ดีหลายประการลดลง เช่น การผ่านความร้อนจากกระบวนการผลิตมาแล้วในครั้งแรก เมื่อนำมาผ่านกระบวนการนำกลับมาใช้ใหม่จะไหม้ได้ง่าย ก้นถุงพลาสติกจะผนึกติดกันยากขึ้น และอายุการใช้งานของพลาสติกจะสั้นลงด้วย(Evans และ Sikdar, 1987 ; Leaversuch และคณะ, 1987)

จากปัญหาขยะที่เพิ่มขึ้นโดยลำดับดังเป็นที่ทราบกันดีโดยทั่วไป ทำให้นักวิทยาศาสตร์มีความสนใจที่จะหาวัสดุหรือพลาสติกชนิดใหม่ๆ ที่มีลักษณะที่ดีหรือมีการปรับปรุงให้เหมาะสมทั้งประโยชน์ใช้งานและง่ายต่อการกำจัดไปพร้อมกัน วัสดุที่น่าสนใจคือ พลาสติกย่อยสลายได้ (degradable plastic) ที่มีสมบัติของพลาสติกที่ใช้อยู่ในปัจจุบันกับสามารถถูกย่อยสลายได้ และผลจากการย่อยไม่มีสารที่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม ดังเช่นสารพิษที่เกิดจากการย่อยพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ทำให้เกิดมลภาวะหรือสารตกค้างในน้ำหรือบริเวณใกล้เคียง (Narayan, 1993) พลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

1. พลาสติกที่ถูกย่อยสลายโดยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีหมู่คาร์บอนิล (C=O) ซึ่งมีความไวสูงต่อแสง UV ทำให้เกิดการแตกตัวในสายพอลิเมอร์ พลาสติกจะกรอบและแตกได้ หรือมีการเติมสารเติมแต่งชนิดที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำลายสายพอลิเมอร์ (photoactivator) เมื่อได้รับแสง UV เช่น เหล็ก และทองแดง เป็นต้น

2. พลาสติกที่มีการเติมสารเติมแต่งชนิดที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น แป้ง ข้าว ข้าวโพด เป็นต้น ลงในพลาสติก เช่น พอลิเอทิลีน (polyethylene, PP) พอลิโพรพิลีน (polypropylene,PE) และพอลิสไตรีน (polystyrene, PS) เป็นต้น เมื่ออนุภาคของแป้งถูกย่อยโดยจุลินทรีย์พลาสติกจะอ่อนตัวมีความพรุนและพื้นที่ผิวมากขึ้นช่วยในการทำลายร่างแหของพลาสติก

3. พลาสติกชนิดเทอร์โมพอลิเมอร์(thermopolyester) ที่ผลิตจากกระบวนทางชีวภาพ เทอร์โมพอลิเอสเทอร์นี้ถูกสังเคราะห์และสะสมได้ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด และจัดอยู่ในสารที่เรียกว่า พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates ,PHA) พลาสติกกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายโดยสมบูรณ์ในธรรมชาติ (biodegradable thermoplastic) (Evans และ Sikdar, 1987 ; Brand และคณะ, 1990)

พลาสติกที่ผลิตจากแบคทีเรียเป็นกลุ่มพอลิเอสเทอร์ ซึ่งได้แก่ PHA เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ poly(3hydroxybutyrate) ; P(3HB) หรือ PHB และ พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต หรือ poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate ;

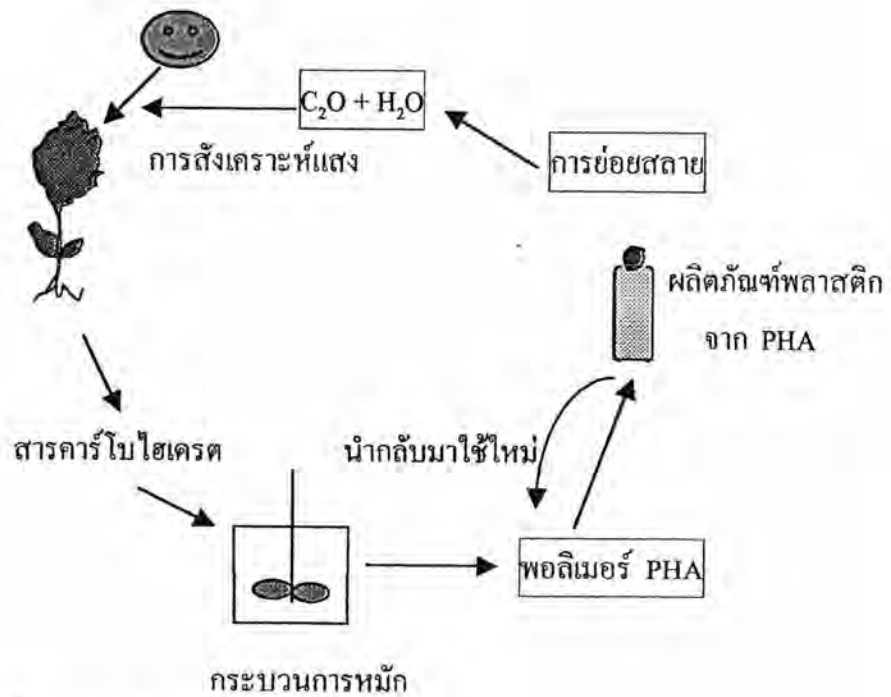
P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV ซึ่งบริษัทซีนีคาไบโอโพรดักท์ (บริษัทในเครือไอซีไอ) ประเทศอังกฤษ ได้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นแห่งแรกมีชื่อการค้าว่า ไบโอโพล (BIOPOL) PHA เป็นพลาสติกชนิดที่สามารถถูกหลอมขึ้นรูปได้เมื่อได้รับความร้อน (thermoplastics) ที่มีสมบัติต่างๆใกล้เคียงกับ PP และ PE ถึงแม้ว่า PHA นี้สามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีในการใช้งานบางอย่างได้เป็นอย่างดี แต่มีข้อเสียเปรียบในด้านราคาต้นทุนในการผลิต Haggi (1995) รายงานว่าพลาสติกที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีราคาสูงถึงกิโลกรัมละประมาณ 16 ดอลลาร์สหรัฐ จึงทำให้ยังเป็นประเด็นที่ต้องศึกษาวิจัยต่อไป อย่างไรก็ตามถ้าความต้องการในการใช้งานมากขึ้นในอนาคต รวมทั้งมีการวิจัยและพัฒนาในด้านการผลิตและสามารถทำให้ต้นทุนการผลิตลดลงได้ พลาสติกจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ประโยชน์

ตารางที่ 1.1 เปรียบเทียบสมบัติทางเคมีและกายภาพของ PP และ PBA (Evans และ Sikdar, 1987 Brandl และคณะ, 1990)

สมบัติทางเคมีและกายภาพ	PP	PBA
จุดหลอมเหลว (°ซ)	171-186	171-182
ความสามารถเป็นผลึก(%) (crystallinity)	65-70	65-80
ความหนาแน่น (g/cm^3)	0.94-0.95	1.23-1.25
น้ำหนักโมเลกุล ($\times 10^5$)	2.2-7.0	1-8
การกระจายน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	5-12	2.2-3.0
ความแข็ง (Gpa) (flexurul modulus)	1.7	3.5-4.0
การต้านแรงดึง (MPa) (tensile strenght)	39	40
ความสามารถในการขยายตัว (%) (extension to break)	400	6-8
ความทนทานต่อแสงอัลตราไวโอเลต(UV. Resistance)	ไม่ดี	ดี
ความทนทานต่อตัวทำละลาย(solvent resistance)	ดี	ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน ($cm^{-3} m^{-2} atm^{-1} d^{-1}$) (oxygen permeability)	1700	45

PHA

PHA เป็นกลุ่มพอลิเอสเทอร์ของสารไฮดรอกซีอัลคาโนเอต(hydroxyalkanoates ,HAs)ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายชนิด เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในภาวะที่จำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม เป็นต้น ในขณะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ จะมีการสังเคราะห์และสะสม PHA เพิ่มขึ้น PHA ถูกสะสมภายในเซลล์ในรูปของแกรนูล โดยที่ขนาดและจำนวนแกรนูลต่อเซลล์จะแตกต่างใน แต่ละชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Alcaligenes eutrophus* ในหนึ่งเซลล์จะมีจำนวนแกรนูล 8-13 แกรนูล และขนาดแกรนูลเท่ากับ 0.24 – 0.50 μm (Byrom ,1994) การตรวจหา PHA ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นโดยการใช้เทคนิคการย้อมสีซูดานแบล็คบี (Schlegel และคณะ ,1970) หรือ ไนล์บลู (Ostle และ Schlegel , 1982) จากการศึกษาพบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งที่เป็นแกรมบวก และ แกรมลบประมาณ 300 ชนิด สามารถสร้างและสะสม PHA (Steinbuchel ,1991) สมบัติของ PHAที่ดีกว่าพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติชนิดอื่นๆก็คือเป็นเทอร์โมพลาสติก(thermoplastics) มีความยืดหยุ่นใกล้เคียงกับ PP และสามารถย่อยสลายได้สมบูรณ์ในทุกสภาวะแวดล้อมโดยจุลินทรีย์ เช่น ในดิน ทะเล ทะเลสาบ และในน้ำเสีย ผลจากการย่อยสลายได้น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (Brandl และคณะ ,1995) ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 วัฏจักรของ PHA (Lee, 1996a)

ตารางที่ 1.2 การสร้างและสะสม PHA โดยจุลินทรีย์

ชนิดจุลินทรีย์	ปริมาณPHA สูงสุด(%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างPHA	เอกสารอ้างอิง
Hyphomicrobium methylovorum	12.5	methanol	Matsumoto และคณะ (1992)
Methylobaterium organophilum	7.5	methanol	
Methylobaterium fijisawaense	17.7	*n*-amyl alcohol	
Methylobaterium extorquens	29.7	methanol	
Xanthobacter autothrophicus	16.2	*n*-amyl alcohol	
Paracoccus denitrificans	53.2	*n*-amyl alcohol	
Pseudomonas lemoignei	17.8	*n*-amyl alcohol	
Pseudomonas oleovorans	2.50	*n*-amyl alcohol	
Bacillus cereus	13.0	glucose+propionic	Ramsay และคณะ (1990)
Alcaligenes latus	53.0	sucrose+propionic	
Pseudomonas pseudoflava	43.0	glucose+propionic	
Pseudomonas cepacia	64.0	glucose+propionic	
Micrococcus halodennitrificans	21.0	glucose+propionic	
Alcaligenes eutrophus	43.0	glucose+propionic	
Alcaligenes faecalis	8.0	glucose	Renner และคณะ (1996)
Alcaligenes xylosoxidans	18.0	glucose	
Derxia gummosa	32.0	sodium butyrate	
Burkhalderia solanacearum	37.0	glucose	
Acidovorax delafieldii	4.0	sodium acetate	
Acidovorax facilis	2.0	glucose	
Paucisprillum metamorphum	28.0	sodium acetate	
Methylobacterium rhodesianum	-	fructose	Ackermann และBabel(1997)
Rhodococcus sphaeroids	67.0	palm oil mill effluent	Hassan และคณะ (1996)
Azatobacter vinelandii	47.0	sucrose	Martinez และคณะ(1997)
Paracoccus pantotrophus	-	acetate	Leeuwen และคณะ(1997)
Rhodococcus ruber	-	glucose	Anderson และคณะ(1995)
Pseudomonas aeruginosa	12.0	euphobia oil	Eggink และคณะ(1995)
Pseudomonas oleovorans	-	sodium acetate	Kim และคณะ(1995)
Pseudomonas putida	-	sodium acetate	Kim และคณะ(1995)

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

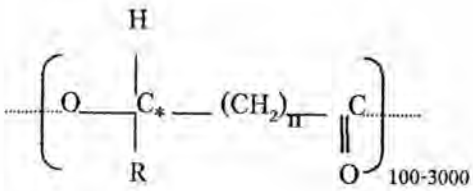
ชนิดจุลินทรีย์	ปริมาณ PHA สูงสุด(%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับ PHA	เอกสารอ้างอิง
Hydrogenophaga pseudoflava	62.0	Glucose + lactones	Choi และคณะ(1995)
Azosprillum brasilense	-	n-alkanoic acid	Hzigsohn และคณะ(1995)
Azotobacter paspali	70.0	hydroxyalkanoates	Hzigsohn และคณะ(1995)
Micrococcus holodentrificans	21.0	glucose + propionic	Ramsay และคณะ(1990)
Chromobacterium violaceum	65.0	valerate	Steinbuchel และคณะ(1993)
Actinobacillus sp.	43.0	glucose + alcohol	Son และคณะ(1996)
Synechococcus sp.	1.0	BG – 11	Suzuki และคณะ(1996)
Sphaerotilus natans	50.0	glucose	Takada และคณะ(1995)
Burkholderia sp.	70.0	sucrose + glucose	Rodrigues และคณะ(1995)
Xanthobacter autotrophicus	17.0	-	Rodrigues และคณะ(1995)

การค้นพบ PHA

PHB เป็น PHA ชนิดแรก ที่ถูกสร้างและสะสมใน *Bacillus megaterium* โดยLemoigne เป็นผู้รายงานการค้นพบในปี 1959 (อ้างถึงในSteinbuchel และ Valentin , 1995) ในปี ค.ศ. 1974 Wallen และ Rohwedder ได้รายงานว่าพบโมโนเมอร์ชนิดใหม่ เป็น 3-hydroxyvalerate หรือ 3HV 3-hydroxyoctanoate หรือ 3HC และ 3-hydroxyheptanoate หรือ 3HH ซึ่งจะประกอบรวมกับ PHB เป็นเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มจาก activated sewage sludge เฮทเทอร์โรพอลิเมอร์นี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก PHB คือ มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าและละลายในเฮทธานอลร้อน จึงเสนอให้เรียกสารกลุ่มนี้ว่า PHA

โครงสร้างของ PHA

โครงสร้างของ PHA เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวที่หนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวที่สอง ตรงตำแหน่งบีต้าคาร์บอน ซึ่งจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) ที่แสดงโครงสร้างเป็น R- configuration การเชื่อมกันของแต่ละโมโนเมอร์เป็นแบบหางต่อหัว (isotactic) เหมือนกับ PP (Brandl และคณะ,1990)



รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างของ PHA (⋯⋯) คือ พันธะเอสเทอร์ และ * คือ ตำแหน่งบีต้าคาร์บอน (Lee ,1996a)

เมื่อ n= 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_{10}) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) ; P(3HX)
R = เพนธิล(C_5H_{11}) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) ; P(3HO)
R = โนนิล (C_9H_{19}) สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอต) ; P(3HD)

เมื่อ n= 2 R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ; P(4HB)
R = เมทธิล (CH_3) สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ; P(4HV)

เมื่อ n= 3 R = ไฮโดรเจน (H) สารนี้คือ พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ; P(5HV)
R = เมทธิล (CH_3) สารนี้คือ พอลิ(5-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) ; P(5HX)

เมื่อ n = 4 R = เฮกซิล (C_6H_{13}) สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอต) ; P(4HD)

การจัดจำแนกกลุ่มของ PHA โดยการใช้ชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA แบ่งเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน เช่น พอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ Poly(β -hydroxybutyrate) ; P(3HB)

2 เฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งจะเรียกชื่อตามจำนวนชนิดของโมโนเมอร์ ดังนี้

2.1 โคพอลิเมอร์(copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิด มาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ ได้แก่ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือP(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) ; P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) หรือ P(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) ; P(3HB-co-3HH) และ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกโพรพิโอเนต) หรือP(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) ; P(3HB-co-3HP) (Shimamura และคณะ,1994)

2.2 เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ พอลิ(3 –ไฮดรอกซีบิวทิเรต – โค – 3 – ไฮดรอกซีวาเลอเรต – โค – 4 - ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3 – hydroxybutyrate – co– 3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) ; P(3HB-co-3HV-co-4HB) พอลิ(3 – ไฮดรอกซีบิวทิเรต – โค – 3 – ไฮดรอกซีวาเลอเรต – โค - 4- ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(3–hydroxybutyrate - co– 3– hydroxyvalerate–co- 4-hydroxyvalerate) ; P(3HB-co-3HV-co-4HV) และ พอลิ(3 - ไฮดรอกซีบิวทิเรต - โค - 3 - ไฮดรอกเฮกซะโนเอต - โค -4- ไฮดรอกออกตะโนเอต) หรือ P(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate) ; P(3HB-co-3HH-co-3HO) (Valentin และคณะ,1994)

การแบ่งประเภทของ PHA ตามจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมโนเมอร์ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (Jendrossek และคณะ,1996)

1 short-chain-length PHA (PHA_{SCL}) มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนเท่ากับ 3-5 อะตอม

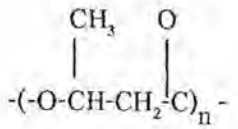
2 medium-chain-length PHA (PHA_{MCL}) มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนเท่ากับ 6-15 อะตอม

3 long-chain-length PHA (PHA_{LCL}) มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนมากกว่า 15 อะตอม

PHA ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นจะเป็น PHA ชนิดใดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะในการเลี้ยงเชื้อ (Doi และคณ, 1995)

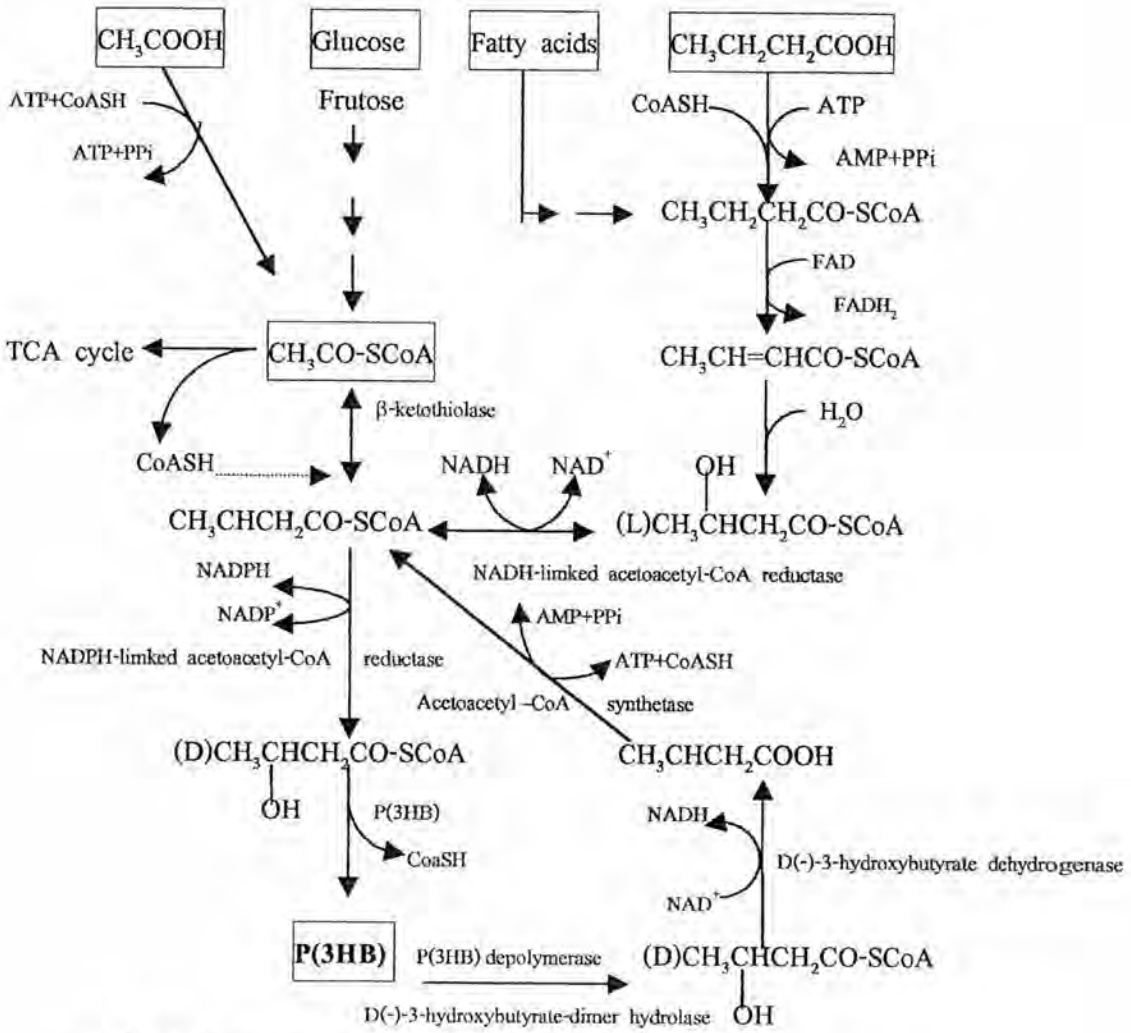
วิถีการสังเคราะห์ PHA

1 วิถีการสังเคราะห์ PHB



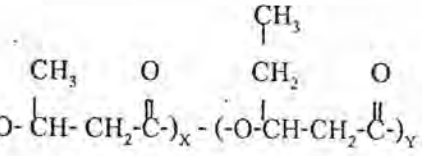
รูปที่ 1.3 สูตรโครงสร้างของ PHB (Doi , 1990)

Senior และ Dawes (1973) Oeding และ Schlegel (1973) ได้สรุปว่าสารตั้งต้นของวิถีการสังเคราะห์ PHB คือ acetyl-CoA Doi และคณะ (1986) รายงานว่าจุดสำคัญในการควบคุมวิถีการสังเคราะห์ PHB คือ β-ketothiolase ซึ่งจะถูกยับยั้งเมื่อ CoA ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 วิถีการสังเคราะห์และย่อยสลาย PHB (Doi, 1990)

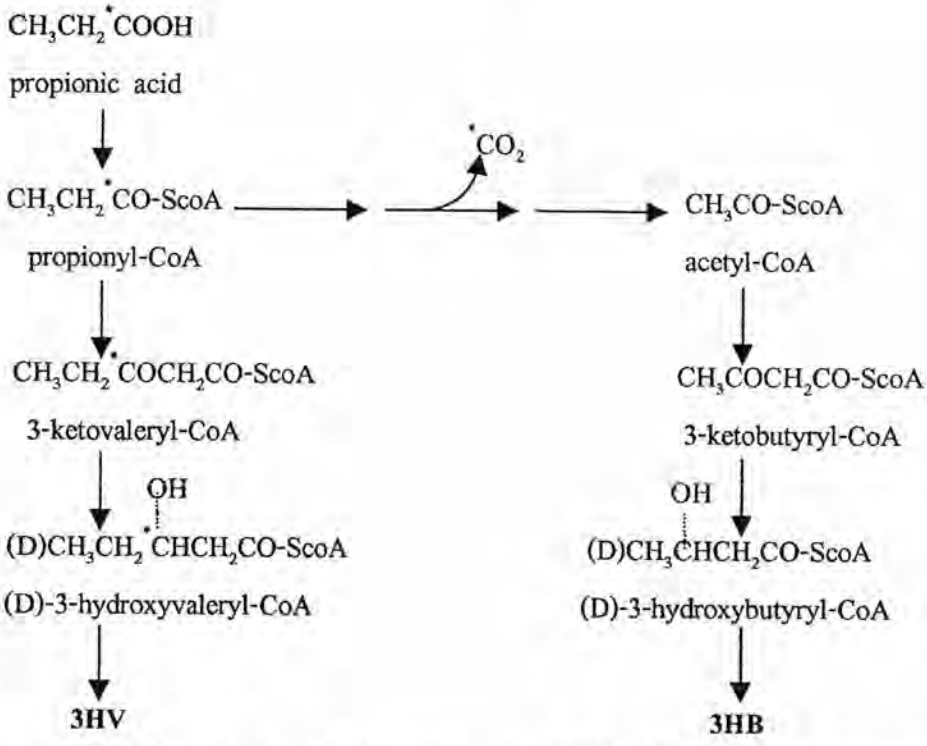
2.วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV)



รูปที่ 1.5 สูตรโครงสร้างของ P(3HB-co-3HV) (Doi , 1990)

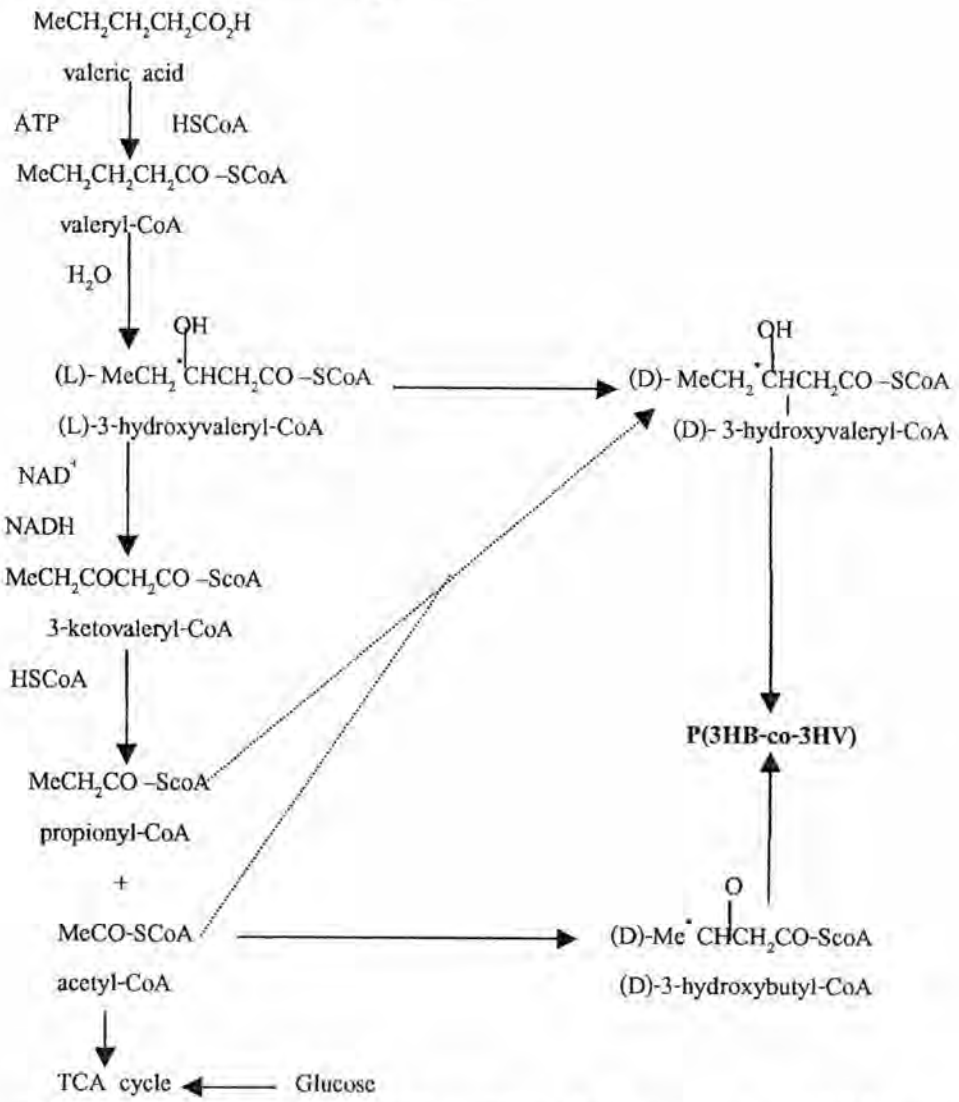
การสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

Alcaligenes eutrophus H16 มีความสามารถสร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) ได้จากโพรพิโอเนต(C_3) โดยที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงถึง 90 โมลเปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบ 3HB และ 3HV ซึ่งมาจากโพรพิโอเนตทำโดยการติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี [1-C^{13}] ซึ่งสามารถสรุปวิถีการสังเคราะห์ได้ดังแสดงในรูปที่ 1.6



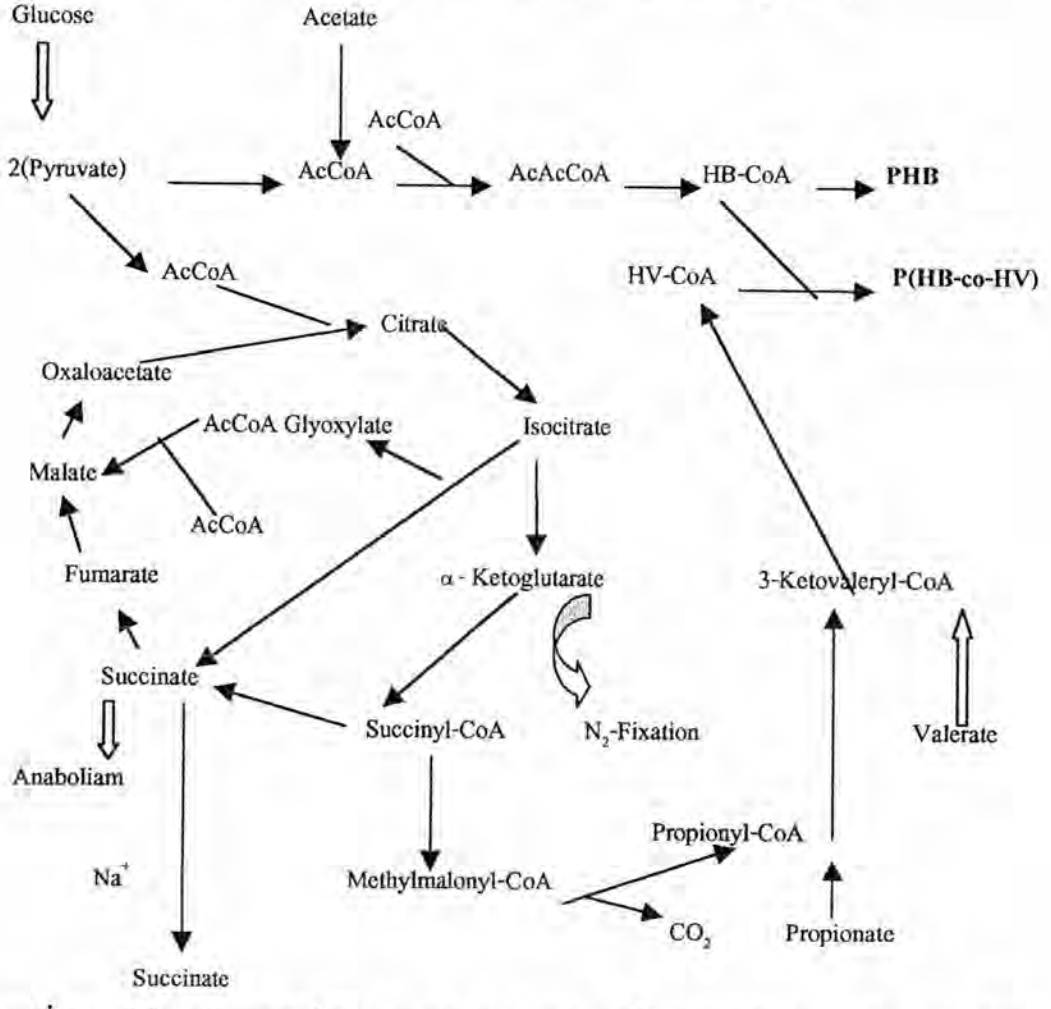
รูปที่ 1.6 วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดยใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ใน *Alcaligenes eutrophus* (Doi , 1990) * หมายถึงตำแหน่งที่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี

ในปี 1987 Doi และคณะ ได้ทดลองใช้กรดเพนทาโนอิก(กรดวาเลอริก) เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ใน *Alcaligenes eutrophus* ซึ่งได้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HB เท่ากับ 10 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 3HV เท่ากับ 90 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยที่กรดเพนทาโนอิกจะถูกเมตาโบไลซ์ด้วยปฏิกิริยาบีต้าออกซิเดชั่น(β-oxidaton) เป็น D-3-hydroxyvaleryl-CoA ซึ่งเป็น 3HV โดยตรงที่ไม่มีการตัดสายคาร์บอน (carbon skeleton) ส่วน L-3-hydroxyvaleryl-CoA ถูกสลายไปเป็น acetyl-CoA และ propionyl-CoA ซึ่ง acetyl-CoA จะถูกเมตาโบไลซ์เข้า TCA cycle และบางส่วนจะถูกเปลี่ยนอยู่ในรูป D-3-hydroxybutyrl-CoA ถูกเมตาโบไลซ์ เป็น 3HB ต่อมา 3HV และ 3HB เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชั่นโดยเอนไซม์พอลิเมอร์เรส รวมกันได้เป็น P(3HB-co-3HV) แสดงวิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) จากกรดวาเลอริก ในรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดย *A.eutrophus* เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว (Doi และคณะ 1987)

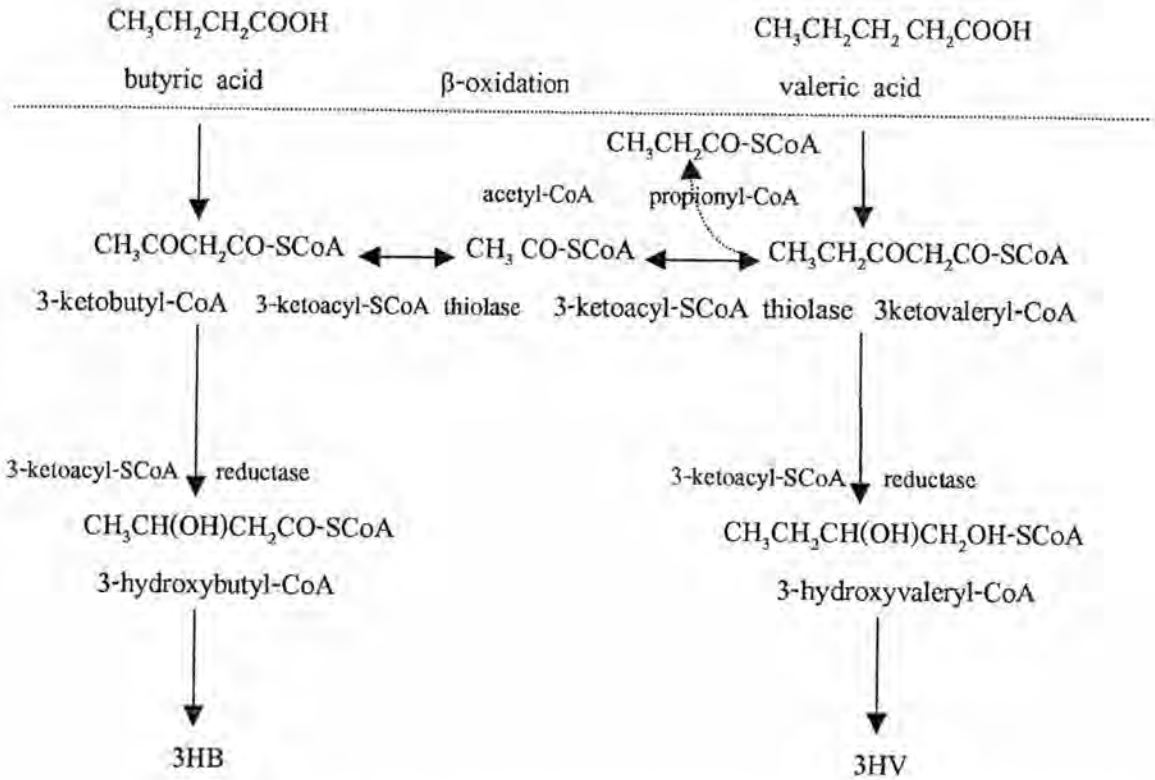
William และคณะ (1994) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) ใน *Rhodococcus ruber* โดยใช้กรดซัคซินิก เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะถูกเมตาโบไลซ์เป็น methylmalonyl-CoA โดยเอนไซม์ methylmalonyl- CoA mutase ได้เป็น propionyl-CoA acetyl-CoA ซึ่งได้จากกรดซัคซินิกเข้า TCA cycle ถูกเมตาโบไลซ์ไป oxaloacetate จากนั้นถูก decarboxylation เป็นไพรูเวท และเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ 3HB และรวมกับ propionyl-CoA ได้ P(3HB-co-3HV) ในปี 1997 Page และคณะ ได้ศึกษาการผลิต P(3HB-co-3HV) จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ โดย *Azotobacter salinestris* พบว่าเมื่อใช้ melibiose ได้สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 12 โมลเปอร์เซ็นต์ และได้เสนอว่าสามารถเพิ่มสัดส่วน 3HV ให้สูงขึ้นได้ด้วยการเติมกรดวาเลอริกลงในอาหารที่มีกลูโคส แต่ถ้าเป็นกรดโพรพิโอนิกจะให้ 3HV โดยตรง สามารถใช้เป็นคาร์บอนเดี่ยวได้ วิถีการสังเคราะห์ PHB และ P(3HB-co-3HV) ดังแสดงในรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.8 วิถีการสังเคราะห์ PHB และ P(3HB-co-3HV) โดย *Azotobacter salinestris* จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (Page และคณะ1997)

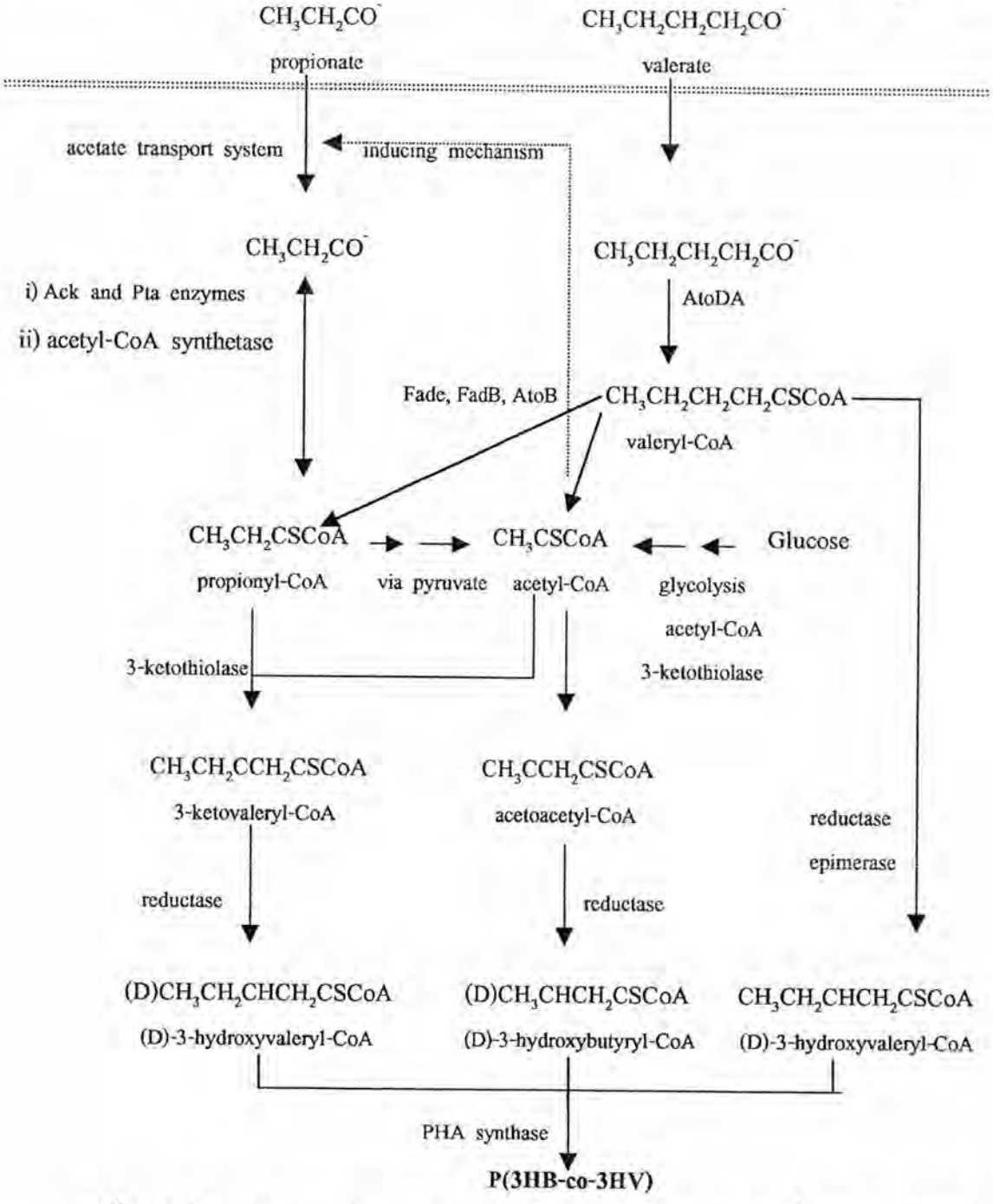
การสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) จากแหล่งคาร์บอนผสม

Doi และคณะ (1988) ได้ศึกษาการผลิต (P3HB-co-3HV)จาก *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดบิวทิริกและกรดวาเลอริก ซึ่งกรดทั้งสองชนิดจะถูกเมตาโบไลซ์โดยปฏิกิริยาบีต้าออกซิเดชั่น โดยที่กรดวาเลอริก(C_5) ถูกเมตาโลไลซ์ได้เป็น 3-ketovaleryl-CoA แล้วถูกเมตาโบไลซ์ต่อโดยเอนไซม์ 3-ketovaleryl-CoA reductase ได้เป็น 3-hydroxyvaleryl –CoA และ 3-ketovaleryl-CoA บางส่วนถูกเมตาโบไลซ์ได้ acetyl-CoA (C_2) และ proopionyl-CoA(C_3) โดยเอนไซม์ 3-ketovaleryl-CoA thiolase ซึ่ง acetyl-CoA จะเป็นสารตั้งต้นของ 3HB แสดงวิถีการสังเคราะห์ในรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.9 วิถีการสังเคราะห์ PHB และ P(3HB-co-3HV) ที่มีกรดบิวทิริกและกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ใน *Alcaligenes eutrophus* (Ishihara และคณะ, 1996)

Kim และคณะ 1995 ได้ศึกษาการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดยใช้ recombinant *E.coli* ที่มีพลาสมิด XL1-Blue ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และมีกรดโพรพิโอนิกผสมอยู่ด้วย ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณ PHA และสัดส่วนของ 3HV โดยการใช้อะซิเตท และ / หรือ โอเลเอท เป็นสารชักนำ (inducing) และได้เสนอวิถีของการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV)ดังแสดงในรูปที่ 1.10



รูปที่ 1.10 วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดย recombinant *E.coli* เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิก และกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน (Kim และคณะ, 1995)

การสร้างและสะสม PHA โดย *Bacillus* sp. และแบคทีเรียบางชนิด

Holmes (1985) รายงานว่า *Alcaligenes eutrophus* สามารถสร้างและสะสม PHB ได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) Ramsay และคณะ (1989) พบว่า *Pesudomonas cepacia* สามารถใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการสร้างและสะสม PHB ได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และสามารถผลิต P(3HB-co-3HV) ซึ่งมีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV โมลเปอร์เซ็นต์ในอาหารที่ประกอบด้วย ฟรุกโตสกับกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนผสม Bourgue และคณะ(1992) รายงานว่า *Methylobacterium extorqueus* สามารถใช้เมทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิต PHB และเมื่อใช้โซเดียมวาเลอเรตร่วมกับเมทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนผสมสามารถสร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) Steinbuchel และคณะ(1992) พบว่า *Chromobacterium violaceum* สามารถผลิตโฮโมพอลิเมอร์ P(3HV)ได้สูงถึง 65 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารที่ประกอบด้วยกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟรุกโตส กลูโคเนต โพรพิโอเนต หรือเฮกซะโนเอต ยังสามารถสังเคราะห์ P(3HB) ได้ Rhee และคณะ (1993) รายงานว่า *Acitobacter* sp. สามารสร้างและสะสม PHB เมื่อเลี้ยงในอาหาร ที่ประกอบด้วยอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนและจำกัดปริมาณซัลเฟต และ สามารถผลิต P(3HV) เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน Chen และคณะ (1991)รายงานว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถสร้างและสะสม PHB ได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิก หรือกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนผสมกับกลูโคส จะสามารถสร้างและสะสมP(3HB-co-3HV) ได้

Bacillus sp. ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถสร้างและสะสม PHA (Chen และคณะ,1991)

B. amyloliquefaciens	*B. megaterium*
B. mycoids	*B. cereus*
B. sphaericus	*B. circulans*
B. subtilis	*B. laterosporus*
B. thuringiensis	*B.licheniformis*

Lee และคณะ (1995) ได้ศึกษาการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยใช้ *B. thuringiensis* R-510 ใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกลูโคสร่วมกับกรดโพรพิโอนิก ได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 44.5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และสัดส่วนของ 3HV สูงถึง 80.2 โมลเปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ P(3HB-co-3HV) ที่ได้มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number average molecular weight, M_n) เท่ากับ 53,000 - 65,000 และ ค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (polydispersity index, M_w/M_n)

ระหว่าง 1.5 - 2.2 *B. thuringiensis* R-510 สามารถให้สัดส่วนของ 3HV สูงถึง 50 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อใช้กลูโคสและกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนผสม ซึ่งการที่จุลินทรีย์ทนต่อกรดอินทรีย์ได้ดี และยังให้สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV สูง โดยที่ใช้ปริมาณกรดอินทรีย์ต่ำเป็นข้อได้เปรียบประการหนึ่งที่นำไปสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม *B. thuringiensis* มีความสามารถในการทนต่อการเป็นพิษที่ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกถึง 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) Kofronova และคณะ (1994)รายงานว่าขนาดแกรนูล PHB ของ *B. megaterium* มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ไมโครเมตรเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส และได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 35- 45 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงเริ่มเข้าสู่ stationary phase Mirtha และคณะ (1995) รายงานว่า *B. megaterium* ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์โดยใช้ *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine ไม่สร้างและสะสม PHB เนื่องจากเอนไซม์ β-ketothiolase และ NADPH – dependent acetoacetyl- CoA reductase ไม่สามารถทำงานได้

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิต PHA

ชนิดและคุณสมบัติของ PHA ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์และสะสมได้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนเป็นสำคัญ(นอกเหนือจากชนิดของเชื้อและภาวะในการเลี้ยงเชื้อ) ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA จึงมีความสำคัญมาก Homes (1985) รายงานว่า *Alcaligenes. eutrophus* สามารถสร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) จากแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกลูโคสและกรดโพรพิโอนิกได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 33 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยที่ค่าสัดส่วนของ 3HB และ 3HV ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างกลูโคสและกรดโพรพิโอนิก นอกจากนี้สามารถใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-43%3HV) แต่ทำให้ปริมาณโคพอลิเมอร์ลดลงเหลือ 35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้กรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวพบว่าได้โฮโมพอลิเมอร์ PHB เพียงอย่างเดียว ในปี 1986 Doi และคณะ รายงานว่า *A. eutrophus* สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-43%3HV) จากแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างโซเดียมอะซิเตท และโซเดียม-โพรพิโอเนท Doi และคณะ(1987) ได้รายงานว่า *A. eutrophus* สามารถใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-90%3HV) และเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดบิวทิริกและกรดวาเลอริกผลิตได้โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงกว่าเมื่อใช้กลูโคส

ผสมกับกรดโพรพิโอนิก นอกจากนี้เมื่อใช้คาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสและกรดวาเลอริกพบว่าได้สัดส่วนของ 3HV สูงกว่าการใช้กลูโคสและกรดโพรพิโอนิก (Haywood และคณะ, 1998 ; Kim และคณะ, 1995) Doi และคณะ (1988) รายงานพบว่าเมื่อเลี้ยง *A. eutrophus* โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นกรดบิวทิริกและกรดวาเลอริกที่มีความเข้มข้นรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ผลิตได้โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV ระหว่าง 0-90 โมลเปอร์เซ็นต์และได้ปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 37-55 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Page(1989) ได้รายงานว่า *Azotobacter vinelandii* UWD สามารถใช้ ไนโตรเจนชนิดที่ซับซ้อน (complex nitrogen) ได้แก่ fish peptone ในการสร้างและสะสม PHB ที่มีกลูโคส และ corn syrup เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 75 และ 77 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ Bitar และ Underhill (1990) รายงานว่าการผลิต PHB โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่ำทำให้ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อโดยให้ปริมาณแอมโมเนียมคลอไรด์ที่สูงกว่า Daniel และคณะ (1992) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นเกลือแอมโมเนียมในรูปต่าง ๆ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียม-ไฮโดรเจนคาร์บอเนต และ แอมโมเนียมไนเตรตไม่ทำให้การเติบโตของชนิดแบคทีเรีย*Pseudomonas* 135 แตกต่างกัน ในปี 1992 Steinbuchel และ Pieper รายงานว่า *A. eutrophus* ซึ่งได้ทำให้เป็นสายพันธุ์กลายชนิดที่จำเป็นต้องใช้ isoleucine ในการเติบโต (isoleucine auxotrophic mutant) สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ในภาวะที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวที่มีโครงสร้างซึ่งต่างจากโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ (single unrelated carbon sources) ได้แก่ ฟรุกโตส กลูโคเนท อะซิเตท ซัคซิเนท และ แลคเตท แต่สัดส่วนของ 3HV ที่ได้สูงสุดเพียง 8 โมลเปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาโบลิซึมของกรดอะมิโนในเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าว และทำให้ปริมาณโพรพิโอนิลโคเอที่เป็นสารตั้งต้นของ 3HV ลดลง จึงทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV ลดลง Hori และคณะ (1994) รายงานว่า การเลี้ยง *Pseudomonas putida* โดยการหมักแบบขั้นตอนเดียว โดยใช้ออกทาโนเอท และ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ โดยอัตราส่วนของ C/N ต่ำ พบว่าทำให้ปริมาณ PHB ที่ได้ต่ำไปด้วย เนื่องจากเซลล์ใช้แหล่งคาร์บอนสำหรับการเติบโตมากกว่าการสร้าง PHB นอกจากนี้ในการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. SH-69 แบบกึ่งต่อเนื่อง (fed batch culture) ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสและแอมโมเนียม โดยลดอัตราส่วนของ C/N พบว่าสัดส่วนของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ต่ำลง (Rhee และคณะ,1993) Taidi และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ที่ผลิตโดย *A. eutrophus* พบว่าชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน (ฟรุกโตส อะซิเตท และกรดบิวทิริก) ไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ที่ผลิตโดย *A. eutrophus* ซึ่งต่างจาก *Methylobacterium*

extroquens ที่น้ำหนักโมเลกุลของ PHB ขึ้นกับปริมาณของแหล่งคาร์บอน การจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ และสะสม PHB (Repaske และคณะ, 1976 ; Suzuki และคณะ, 1986) Beaulieu และคณะ (1995) รายงานว่า *A. eutrophus* สามารถผลิต PHB ได้จากกากน้ำตาลอ้อย (canc molasscs) ความเข้มข้นเท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.5-1.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าเกลือแอมโมเนียมในรูปอื่น ๆ Doi และคณะ (1995) รายงานว่าการที่แต่ละโมโนเมอร์สามารถรวมเป็นโคพอลิเมอร์ขึ้นกับชนิดของแหล่งคาร์บอน ภาวะการเลี้ยงเชื้อและชนิดของแหล่งคาร์บอนสำหรับแต่ละโมโนเมอร์

การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก

การที่ราคาของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์มีราคาสูง(กิโลกรัมละ 16 ดอลลาร์สหรัฐ)เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเคมี (Byrom, 1987) นอกเหนือจากกระบวนการสกัดแยกและทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นส่วนที่มีค่าใช้จ่ายสูง(Ramsay และคณะ,1990) แล้วราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งคาร์บอนก็เป็นอีกส่วนหนึ่งที่ทำให้พลาสติกประเภทนี้มีราคาต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบของสารที่ใช้ในปริมาณมากกว่าสารอาหารอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตสูงและมีราคาถูกด้วยจะสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ ดั้งนั้นจึงได้มีการวิจัยเพื่อผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ที่มีราคาถูก เช่น วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Schlegel และคณะ , 1961) เอทธานอล (Taylor และ Anthony , 1976) และ เมทธานอล (Braunegg และคณะ ,1978 ; Suzuki และคณะ, 1986) เป็นต้น Page (1989) รายงานว่า *Azotobacter vinelandii* UWD สามารถผลิต PHB โดยใช้อาหารที่มี องค์ประกอบ(ของธาตุคาร์บอน)ซับซ้อน (complex medium) ได้แก่ กากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ malt extract และ corn syrup ซึ่งเลี้ยงแบบ batch culture ได้ปริมาณ PHB มากกว่า 2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ malt extract เพียงอย่างเดียวได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 66 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนกากน้ำตาลจากหัวบีท และ corn syrup ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 60 และ 57 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ Akiyama และคณะ (1992) รายงานว่า *Alcaligenes* sp. AK 201 มีความสามารถสร้างและสะสม PHA จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กรดอัลคาโนอิก (n-alkanoic acid) ที่มีจำนวนคาร์บอน

2 – 22 อะตอม น้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ และไขมันสัตว์ พบว่าเมื่อใช้กรดอัลคาโนอิกที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ น้ำมันพืช และ ไขมันสัตว์ผลิตได้ PHB เมื่อใช้กรดอัลคาโนอิกเป็นเลขคี่เชื้อสามารถสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) ได้ นอกจากนี้ *Pseudomonas oleovorans* สามารถใช้อัลเคนและอัลคีนที่มีคาร์บอน 6 – 12 อะตอมสังเคราะห์ได้โคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีความยาวของสายพอลิเมอร์เท่ากับของสับสเตรทที่ใช้เลี้ยงเชื้อ และที่เหลือเป็นโมโนเมอร์ที่มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนลดลง 2 อะตอม Ueda และคณะ(1992) รายงานว่ากลุ่มแบคทีเรีย methylotrophic สามารถใช้เมทธานอล และเอมิลแอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอน ในภาวะจำกัดไนโตรเจน เพื่อการสร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) โดยปริมาณ และ องค์ประกอบของพอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับ ปริมาณคาร์บอน และสายพันธุ์แบคทีเรีย ในปี 1995 Beaulieu และคณะได้พบว่า *A.eutrophus* มีการสร้างและสะสม PHB จากกากน้ำตาล และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ขึ้นอยู่กับปริมาณกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต ในกากน้ำตาลประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิด เช่น แหล่งเกลือแร่ต่าง ๆ (trace elements) และวิตามิน เช่น ไทมีน ไรโบฟลาวิน ไพริด็อกซิน และ นิโคตินาไมด์ เป็นต้น ซึ่งเป็น growth factor และมีผลต่อการสร้าง PHB กากน้ำตาลเป็นสารอาหารซึ่งมีราคาถูกจึงใช้เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดหนึ่งที่อาจนำไปใช้สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม Juliana และคณะ (1995) ได้รายงานการผลิต PHB จากเฮมิเซลลูโลส ไฮโดรไลเซท โดย *Pseudomonas cepacia* เฮมิเซลลูโลสเป็นวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมทำไม้ แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งใช้เวลาในการย่อยนานและค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีทางเคมี แต่ความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า ผลการย่อยเฮมิเซลลูโลสได้น้ำตาลไซโลสเป็นส่วนใหญ่ และได้อะราบิโนส กลูโคส และ แมนโนส โดยการเลี้ยงเชื้อแบบ batch พบว่าการเติบโตและการสร้าง PHB ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ฟรุกโตส ส่วนราคาต้นทุนการผลิตใกล้เคียงกับการใช้กากน้ำตาล แต่ถูกกว่าการใช้กลูโคสครึ่งหนึ่ง ในปี 1995 Marineztoledo และคณะ พบว่า *Azotobacter chroococcum* สามารถใช้น้ำเสียที่มีอะเพคติน (apectin) เป็นองค์ประกอบจากโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ Hassan และคณะ (1996) รายงานว่า *Rhodobacter sphaeroides* สามารถสร้างและสะสม PHA ได้จากน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม (palm oil mill effluent : POME) ซึ่งมีกระบวนการผลิต 2 ขั้นตอน ดังนี้เริ่มจากนำ palm oil sludge มาทำการหมักในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic treatment) ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 ได้กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก ในขั้นนี้ถ้าพีเอชต่ำกว่า 4 พบว่าเกิดกรดฟอร์มิกขึ้นด้วย ซึ่งทำให้ปริมาณ PHA ลดลง เนื่องจากกรดฟอร์มิกไม่สามารถเปลี่ยนเป็นไพรูเวทได้ (อะซิติลโคเอได้จากไพรูเวท) ต่อจากนั้น *R. sphaeroides* จึงใช้กรดทั้งสองชนิดเพื่อผลิต PHA ซึ่งได้ผลผลิต PHA เท่ากับ 0.50 กรัมต่อกรัมของกรด และได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์ต่อ

น้ำหนักกรด Kato และคณะ (1996) ใช้ *Pseudomonas* sp. 61-3 ผลิตพอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์ (PHB) และ โคพอลิเมอร์ชนิด PHA_{mcl} ; C_4-C_{12} P(3HB-co-3HA) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และแมนโนส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการสร้างและสะสม PHB เกิดในช่วงที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) และมีค่าอัตราส่วนของ C/N ต่ำกว่า 10 หลังจากที่ไนโตรเจนถูกใช้หมดจึงมีการสร้าง PHB รวมทั้ง P(3HB-co-3HA) จากน้ำตาลเมื่อค่าอัตราส่วนC/N มากกว่า 10 ขึ้นไป Son และคณะ (1996) นำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์มาผลิต PHB โดย *Actinobacillus* sp. EL- 9 พบว่าการจำกัดปริมาณสารอาหารบางชนิดไม่มีผลต่อการสร้างและสะสม PHB พบว่าการใช้น้ำทิ้งในรูปที่มีการบำบัดโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.83 กรัมต่อลิตร และ ปริมาณ PHB เท่ากับ 46.5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าการใช้น้ำทิ้งที่ไม่มีการบำบัดก่อนนำมาเลี้ยงเชื้อ Cho และคณะ (1997) ได้นำน้ำเสียจากฟาร์มเลี้ยงสุกร มาใช้เพื่อผลิต P(3HB-co-3HV) โดย *Azotobacter vinelandii* UWD สามารถผลิตพอลิเมอร์ดังกล่าวได้เท่ากับ 34 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมี 3HV เท่ากับ 7.9 โมลเปอร์เซ็นต์ Cromwick และคณะ (1997) รายงานว่า *Pseudomonas oleovorans* *P. ressinvorans* *P. putida* และ *P. citronellolis* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากไขมันวัว (tallow) ชนิดที่มี free fatty acids และ triglyceride เป็นองค์ประกอบได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 18 15 19 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ โดยเฉพาะ *P. oleovorans* สามารถใช้ไขมันวัวที่ไม่ต้องย่อยสลายก่อน (hydrolyzed)สามารถผลิต PHA ได้เท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และสายของพอลิเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 4 - 12 อะตอม แต่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยคาร์บอน 8 และ 10 อะตอม ในปี 1997 Hazenberg และ Witholt รายงานว่า *P. oleovorans* สามารถผลิต PHA ชนิด medium- chain- length (PHA_{mcl}) เมื่อใช้ออกเทน(octane) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยภาวะที่จำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลในการเพิ่มการสร้างและสะสม PHA มากที่สุด ซึ่งมีโอกาสที่จะแข่งขันด้านต้นทุนการผลิตและขยายการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ Ton และ คณะ (1997) รายงานว่า *P. putida* สามารถใช้ น้ำมันจากเปลือกเมล็ดปาล์ม (palm kernel oil) ในรูปของ saponified palm kernel oil (SPKO) กรดลอริก(lauric) กรดไมริสติก (myristic) และ กรดโอเลอิก(oleic) ผลิต PHA ที่มีโม โนเมอร์เป็น n-alkanoate มีจำนวนคาร์บอนในพอลิเมอร์เท่ากับ 6 – 14 อะตอม แต่ส่วนใหญ่มีจำนวนคาร์บอน 8 อะตอม นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เชื้อสามารถเติบโตได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHA ที่มีสมบัติใกล้เคียงกัน ยกเว้นเมื่อใช้กรดโอเลอิกพบว่าได้ปริมาณ PHA สูงกว่า และพอลิเมอร์มีความเหนียวมากกว่า Page และคณะ (1997) ศึกษาพบว่า *Azotobacter salinestris* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่ต้องการอากาศปริมาณน้อยและตรึงไนโตรเจนได้ สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส เมลิไบโอส และกากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กากน้ำตาล

จากหัวบีท กากน้ำตาลจากอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว สามารถสังเคราะห์P(3HB-co-3HV) ซึ่งมีสัดส่วน 3HV เท่ากับ 9 – 12 โมลเปอร์เซ็นต์ และสามารถเพิ่มสัดส่วนของ 3HV ด้วยการใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม อัญชนา ศุรติขจร (2537) รายงานว่า *Alcaligenes* sp.A-04 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHA จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ น้ำมันพืช (น้ำมันปาล์ม และ น้ำมันข้าวโพด) และแอลกอฮอล์ (เอทธานอล และบิวทานอล) รัตนศิริ มุทิตากุล(2538) ได้รายงานว่า *Bacillus* sp.BA-019สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสังเคราะห์และสะสม PHB

ตารางที่ 1.3 ราคาต้นทุนการผลิต PHB จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (Lee, 1996b)

แหล่งคาร์บอน	ราคาของแหล่งคาร์บอน โดยประมาณ US$ kg^{-1}	ผลผลิต PHB g PHB (g substrate) $^{-1}$	ราคา PHB US$(kg PHB) $^{-1}$
กลูโคส	0.493	0.38	1.30
กลูโคสจากการย่อยแป้ง	0.220	-	0.58
ซูโครส	0.290	0.40	0.72
เมทธานอล	0.180	0.43	0.42
กรดอะซิติก	0.595	0.38	1.56
เอทธานอล	0.502	0.50	1.00
กากน้ำตาลอ้อย	0.220	0.42	0.52
Cheese whey	0.071	0.33	0.22
เฮมิเซลลูโลสไฮโดรไลเซท	0.069	0.20	0.34

สมบัติทางกายภาพและเชิงกลของ PHA

PHA มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก (Holmes, 1985) เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นแบบเส้น (Gross และคณะ, 1989) PHA สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายบางชนิด เมื่อได้รับความร้อนจะอ่อนตัวหลอมเหลวเป็นของเหลวหนืด (viscous liquid) และกลับมาแข็งตัวได้อีก (rehardness) เมื่ออุณหภูมิลดลง จึงสามารถนำ PHA จึงนำ PHA มาขึ้นรูปได้ และนำกลับมาหลอมเหลวด้วยความร้อนได้อีก

สมบัติทางเทอร์โมพลาสติกสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ เทอร์โมพลาสติกอสัณฐานหรือไม่เป็นผลึก (amorphous, non-crystalline thermoplasitc) มีสมบัติแข็ง เปราะ ใส เช่น PS กลุ่มที่สองคือ เทอร์โมพลาสติกที่เป็นผลึกบางส่วน (partial, semi-crystalline thermoplasitc) มีโครงสร้างโมเลกุลที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ สามารถเกิดผลึกได้บางส่วน จึงมีสมบัติยืดหยุ่น เหนียวและมีลักษณะขุ่นทึบแสง (cloudy) เนื่องจากผลึกจะขวางทางเดินของแสงและทำหน้าที่กระจายแสง เช่น PE PP เป็นต้น

โครงสร้างของ PHA เป็นแบบหัวต่อหาง (head-to-tail configuration) และเป็นแบบไอไซแทกติก (stereoregular isotactic) (Dawes และ Senior, 1973) คือมีหมู่อัลคิลทุกหมู่ต่ออยู่ด้านเดียวกันของระนาบอย่างสม่ำเสมอ ในการพิจารณาว่าพอลิเมอร์แต่ละชนิดเหมาะกับการใช้งานประเภทใดนั้นขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ปัจจัยสำคัญที่สุดคือจะต้องทราบสมบัติทางกายภาพ (physical properties) และสมบัติเชิงกล (mechanical properties) ของพอลิเมอร์ เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้งานต่อไป

สมบัติทางกายภาพของ PHA

1.อุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น (glass transition temperature, Tg) เป็นอุณหภูมิซึ่งพอลิเมอร์ในอสัณฐานเปลี่ยนสถานะเมื่อได้รับความร้อน โดยจะเปลี่ยนจากสถานะของแข็งคล้ายแก้วไปเป็นสถานะยืดหยุ่นคล้ายยาง เมื่อพอลิเมอร์ได้รับความร้อน ที่อุณหภูมิต่ำกว่า Tg พอลิเมอร์จะมีลักษณะแข็งและเปราะคล้ายแก้ว เนื่องจากโมเลกุลของพอลิเมอร์จะแข็งตัว เคลื่อนที่ไม่ได้ มีการเคลื่อนไหวเพียงการสั่นอย่างเดียว เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า Tg พอลิเมอร์มีปริมาตรเพิ่มมากขึ้นทำให้โมเลกุลของพอลิเมอร์มีการเคลื่อนไหวเนื่องจากได้รับพลังงานจลน์ เป็นผลให้พอลิเมอร์มีความยืดหยุ่นคล้ายยาง

2. อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature, Tm) คืออุณหภูมิที่พอลิเมอร์เปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลว พอลิเมอร์อสัณฐานจะเปลี่ยนสถานะจากของแข็งที่เปราะคล้ายแก้วไปเป็นของแข็งที่มีลักษณะยืดหยุ่นคล้ายยาง เมื่อได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิหลอมเหลวจึงหลอมเหลวเป็นของหนืด

3.น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (average molecular weight) และ ค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (polydispersity index, PDI)

พอลิเมอร์ชนิดเดียวกันอาจประกอบด้วยโมเลกุลที่มีความยาวหรือน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันเรียกว่ามีน้ำหนักโมเลกุลแบบ พอลิดีสเพอร์ส (polydisperse) ดังนั้นจึงไม่สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนของพอลิเมอร์ได้ ซึ่งการหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จะหาเป็นค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลมี 2 วิธี คือ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number average molecular weight, M_n) เป็นค่าเฉลี่ยที่คำนวณจากจำนวนโมเลกุลเป็นหลัก และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight average molecular weight, M_w) เป็นค่าเฉลี่ยที่คำนวณจากน้ำหนักของพอลิเมอร์ เมื่อมีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution) จะทำให้ค่า M_w มากกว่า M_n เสมอ เนื่องจากโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีจำนวนมากกว่าโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และค่า M_w จะเท่ากับ M_n เมื่อทุกโมเลกุลมีขนาดและน้ำหนักเท่ากันหรือเป็นโมโนดีสเพอร์ส (monodisperse) ค่า PDI คำนวณได้จากสูตร

$$PDI = M_w / M_n$$

เมื่อใดที่ PDI มีค่าสูงแสดงว่ามีการกระจายของขนาดและน้ำหนักโมเลกุลมาก (เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตน์, 2538)

ผลของสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV (โมลเปอร์เซ็นต์) ที่มีต่อสมบัติด้านต่าง ๆ

Holmes(1985) รายงานว่า PHB มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ PE แต่มีสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับ PP เช่น ระดับความเป็นผลึก Tg และ Tm เป็นต้น เมื่อพิจารณาสมบัติเชิงกลของ PHB พบว่า มีความแข็งและเปราะ จึงมีข้อจำกัดในการใช้งาน

Bluhum (1986) ศึกษาผลของสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ในโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ที่มีสมบัติด้านต่างๆ เปรียบเทียบกับ PHB พบว่า P(3HB-co-3HV)เป็นโคพอลิเมอร์ที่มีการเรียงตัวของโมโนเมอร์แบบสุ่ม แสดงลักษณะแบบ ไอโซไดมอร์ฟิก (isodimorphic) เนื่องจากการเกิดผลึกร่วมกันระหว่าง (cocrystallization) ระหว่าง 3HB และ 3HV โมโนเมอร์เพราะมีโครงสร้างของผลึกที่คล้ายคลึงกัน Organ และ Barham (1988) ศึกษาลักษณะผลึกและการเกิดนิวคลิเอชั่น (nucleation) ของ P(3HB-co-3HV) พบว่า เมื่อสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV เพิ่มมากขึ้นจะไปลดระดับความเป็นผลึก (% crystallinity) Tg และ Tm ของโคพอลิเมอร์ ทำให้ความแข็งลดลง มีความเหนียวและใสเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลดีต่อการนำไปใช้งานได้กว้างมากขึ้น

Doi (1990) รายงานว่าการเพิ่มความเหนียวของ P(3HB-co-3HV) โดยการเพิ่มสัดส่วน โมโนเมอร์ 3HV นั้นมีข้อจำกัด เนื่องจากเมื่อสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV สูงถึง 40 โมลเปอร์เซ็นต์จะมีจุดหลอมเหลวต่ำสุด(Tm = 75 °ซ)และพบว่าสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HVอยู่ในช่วง 30 ถึง 60โมลเปอร์เซ็นต์

มีลักษณะนิ่มมาก (very soft) เพราะเกิดผลึกแบบซูโดยูแทกติก (pseudoeutactic) แต่ถ้ามีความแตกต่างระหว่างสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์มาก เช่น P(3HB-co-71%3HV) มีสมบัติแข็งและเปราะคล้าย PHB เนื่องจากการเกิดผลึกร่วมกันของ 3HB และ 3HV ลดลง โดยเกิดเป็นผลึกของ 3HB (PHB lacttice) และผลึกของ 3HV (PHV lacttice) มีผลทำให้ระดับความเป็นผลึกและค่า Tm เพิ่มขึ้น

การผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม

บริษัทซีนีคาไบโอโพรดักส์ ประเทศอังกฤษ เป็นบริษัทแรกที่เริ่มการผลิต PHB และ โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *A. eutrophus* โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า ไบโอโพล (BIOPOL) มีกำลังการผลิต 1,000 ตันต่อปี เนื่องจาก P(3HB-co-3HV) มีสมบัติเหมาะต่อการไปใช้ประโยชน์ได้มากกว่า PHB จึงได้มีการพัฒนาขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งต่อเนื่องชนิด 2 ขั้นตอน เพื่อการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยใช้กลูโคสและกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนผสม โดยขั้นตอนแรกเพิ่มปริมาณหัวเชื้อและเซลล์ให้มีการเติบโตในอาหาร glucose-salts medium ที่มีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต การสะสม PHB เกิดขึ้นชั่วโมงที่ 40–60 โดยพบว่าชั่วโมงที่ 60 ฟอสเฟตถูกใช้หมด จึงเติมกรดโพรพิโอนิกในขั้นตอนที่สอง ซึ่งทำให้เกิดการสะสม P(3HB-co-3HV) ที่มีสัดส่วนของ 3HV ตั้งแต่ 0–30 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถกำหนดสัดส่วนดังกล่าวได้ด้วยอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกลูโคส ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากไบโอโพลชนิด P(3HB-co-3HV) ออกวางจำหน่ายเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1990 โดยบริษัทเวลลา (Wella, German hair-care) ประเทศเยอรมนี ผลิตเป็นขวดแชมพู (SANARA) ในขณะที่ประเทศญี่ปุ่นนำไบโอโพลมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง เช่น ถาดสำหรับบรรจุอาหาร ด้ามมีดโกน เป็นต้น(Lee, 1996a) ในด้านราคาต้นทุนการผลิตของ P(3HB-co-3HV) มีราคาสูงกว่า PHB เนื่องจากกรดโพรพิโอนิกที่ใช้มีราคาแพงกว่ากลูโคสสองเท่า (Lee, 1996b) นอกจากนี้บริษัท Biotechnologisch Forschungsgesellschaft (btF) ประเทศออสเตรีย ผลิต PHB จากซูโครส โดย *A. latus* ซึ่งมีกำลังการผลิต 1 ตันต่อสัปดาห์ โดยเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 15 ลูกบาศก์เมตร (Eggink และคณะ,1992 ; Lee, 1995b) แบคทีเรียกลุ่ม methylotrophs ยังเป็นที่สนใจของบริษัทซีนีคาไบโอโพรดักส์ ที่นำมาเพื่อการผลิต PHB เนื่องจากสามารถใช้แหล่งคาร์บอนเป็นเมทธานอลซึ่งมีราคาถูก แต่มีข้อเสียคือความสามารถในการสร้างและสะสม PHB ค่อนข้างต่ำ (ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) รวมทั้งขั้นตอนการสกัดและการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ยุ่งยาก จึงจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นตาม (Lee, 1996) สามารถที่จะกล่าวได้ว่าการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมนั้นจะต้องพิจารณาต้นทุนการผลิตต่อหน่วยเป็นหลัก จึงจะสามารถแข่งขันกับพอลิเมอร์จากปิโตรเคมีได้ โดยที่ต้นทุนส่วน

ใหญ่จะอยู่ที่ราคาของซับสเตรท (แหล่งคาร์บอน) และ ขั้นตอนการสกัดและทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ (product recovery) (Eggink และคณะ, 1992) การปรับปรุงขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ เช่น แบบกึ่งต่อเนื่อง 2 ขั้นตอน เพื่อที่จะเพิ่มปริมาณ PHA (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และอัตราการผลิต PHA (กรัม PHA ต่อลิตร ต่อชั่วโมง) และการพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต (Eggink และคณะ, 1992 ; Lee, 1996a ; Lee,1996b) คาดว่าภายในปี 2000 ตลาดทั่วโลกมีความต้องพลาสติกที่ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ประมาณ 1.4 ล้านตันต่อปี (Lee, 1996b)

ตารางที่ 1.4 บริษัทผู้ผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม (Lee, 1996a)

บริษัท	รูปแบบธุรกิจ ผลิตภัณฑ์และงานวิจัย
Berlin Packing Corp (USA)	การตลาด, ขาย และจัดส่งสินค้า BIOPOL
	จำหน่ายขวด BIOPOL ให้แก่บริษัทผู้ผลิต
	ผลิตภัณฑ์ด้านการบำรุงรักษาเส้นผม
Bioscience Ltd. (Findland)	PHA เพื่อประยุกต์ ใช้ทางการแพทย์
BioVentures Alberta Inc. (Canada)	ผลิต PHA โดยใช้ recombinant *E.coli*
Metabolix , Inc. (USA)	ผลิต PHA โดยใช้ transgenic plants
Monsanto (USA)	ผลิต PHA โดยใช้ transgenic plants
	จากต้นเรปซีด (rapeseed) และต้นถั่ว
Polyferm, Inc. (Canada)	ใช้เฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการ
	ผลิต PHA
	ผลิต PHA จากไซโลส โดยใช้
	Pseudomonas cepacia
ZENECA Bio Products (UK)	ผลิต P(3HB) และ P(3HB-co-3HV)
	จาก *A.eutrophus* โดยการเลี้ยงเชื้อแบบกึ่ง
	ต่อเนื่อง ภายใต้ชื่อการค้าว่า BIOPOL
ZENECA Seeds (UK)	ผลิต PHA โดยใช้ transgenic plants
	จากต้นเรปซีด

การนำ PHA ไปใช้ประโยชน์ (Eggink และคณะ, 1992 ; Lee, 1996a)

1. การใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมและปศุสัตว์ เช่น

1.1 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุปุ๋ย ฮอร์โมน growth factors ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช แคปซูลจะค่อย ๆ สลายทีละน้อยโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินพร้อมกับสารที่บรรจุข้างในถูกปล่อยออกมาทำให้สารดังกล่าวคงอยู่ในดินหรือตำแหน่งที่ต้องการใช้งานได้เป็นเวลานาน จึงเป็นการช่วยประหยัดแรงงาน เวลา และลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังใช้ทำเป็นผ้าพลาสติกคลุมดินรักษาความชื้น ซึ่งเมื่อหมดเวลาการใช้งานจะค่อยๆ ถูกย่อยสลายไปโดยธรรมชาติ

1.2 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยารักษาโรคและวัคซีนต่าง ๆ ในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันโรคระบาด ยาถ่ายพยาธิ และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน เป็นต้น

2. การใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ ซึ่งอาศัยสมบัติในการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) และสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งมีชีวิต โดยนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น

2.1 วัสดุสิ้นเปลืองในงานด้านศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม เข็มเย็บแผล ไหมเย็บแผล ผ้าซับเลือด และผ้าสมานแผล เป็นต้น

2.2 วัสดุเพื่อการบำบัดรักษาโรค ได้แก่ แคปซูลบรรจุยาหรือวัคซีนที่ต้องการให้ตัวยาค่อยๆ ถูกปล่อยออกมาปริมาณน้อยๆ เป็นระยะเวลานาน ใช้ทำกระดูกเทียมโดยอาศัยสมบัติเป็น piezo-electric ของ PHA ซึ่งคล้ายกับสมบัติที่มีในกระดูกธรรมชาติ จึงใช้เป็นแผ่นยึดกระดูกมีผลต่อการสร้างกระดูกใหม่ขึ้นทดแทน

3. การใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์ หรือส่วนประกอบของอุปกรณ์บางประเภท

ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก PHA เช่น ผ้าอนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป ด้ามมีดโกน ขวดแชมพู ขวดใส่น้ำมันเครื่องรถยนต์ ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป และแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร เป็นต้น

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

สืบเนื่องจากปัญหามลภาวะและปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ทวีความรุนแรงมากขึ้น ปัญหาดังกล่าวมีสาเหตุจากหลาย ๆ ด้าน สาเหตุด้านหนึ่งที่มีความสำคัญมากคือ ปัญหาขยะพลาสติกจากปิโตรเคมีที่ยากต่อการย่อยสลายโดยต้องใช้เวลานานนับสิบปีหรือย่อยสลายไม่ได้เลย ซึ่งมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นทุกขณะ จึงทำให้เกิดงานวิจัยและพัฒนาเพื่อหาวัสดุทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีซึ่งมีสมบัติใกล้เคียงและสามารถย่อยสลายได้เองในธรรมชาติในระยะเวลาไม่นาน การผลิตพลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรียเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่อาจช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) พบว่า *Alcaligenes* sp.A-04 สายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิต PHB ได้ปริมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อปรับปรุงวิธีการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าโดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนในอาหาร MSM สามารถผลิต PHB เพิ่มขึ้นเป็น 49 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ชนัญ ผลประไพ (2537) ศึกษาภาวะการเลี้ยง *Alcaligenes* sp.A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต PHB โดยภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหมักเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว ควบคุมพีเอชเท่ากับ 7.0 อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟรุกโตสปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิต PHB เพิ่มขึ้นเป็น 79 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (7.54 กรัมต่อลิตร) แต่เนื่องจาก PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งซึ่งมีสมบัติที่แข็งและเปราะ จึงมีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้งาน ดังนั้นในขณะเดียวกันคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการผลิตเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ ซึ่งมีสมบัติด้านต่างๆดีกว่าโฮโมพอลิเมอร์ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้มากขึ้น อัญชนา ศุรติขจร (2537) ได้รายงานการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์จาก *Alcaligenes* sp.A-04 พบว่าสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดยใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายกลุ่ม ได้แก่ น้ำตาล กรดอินทรีย์ น้ำมันพืช และแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ โดยมีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ที่ได้สูงสุด เท่ากับ 0-90 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อใช้กรดอินทรีย์ (กรดวาเลอริก) เป็นแหล่งคาร์บอน รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ได้ทำการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากธรรมชาติที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสม PHB โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 13.21 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าโดยใช้อาหาร MSM สูตรปรับปรุง โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ PHB และหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ สามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 47.48 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ข้อได้เปรียบของ *Bacillus* sp. BA-019 คือ สามารถใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิต PHB แต่เนื่องจาก PHB มีสมบัติ

ด้านต่างๆ ไม่ดีเท่ากับโคพอลิเมอร์สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้งาน ดังนั้นจึงทำให้เกิดแนวความคิดที่จะผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ซึ่งมีสมบัติทางกายภาพและเชิงกลดีขึ้น จาก *Bacillus* sp. BA-019

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp. BA-019 โดยมุ่งศึกษาถึงปัจจัยที่สำคัญต่อการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) ทั้งในด้านปริมาณของโคพอลิเมอร์ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบได้แก่ สารแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลักสำคัญขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ รวมทั้งศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน ซึ่งจะส่งผลถึงปริมาณและชนิดของโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ รวมทั้งศึกษาสมบัติบางประการของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาผลของชนิด และ ปริมาณของแหล่งคาร์บอน และปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) ที่มีต่อการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 และการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ในด้านปริมาณของโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ รวมทั้งศึกษาสมบัติบางประการของโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ให้ได้เซลล์ปริมาณมากขึ้น และมีประสิทธิภาพในการสร้างและสะสมโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

2. การศึกษาชนิด และ ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 และสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ที่มีชนิดและสัดส่วนของโมโนเมอร์ต่างกัน

3. การศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจน(แอมโมเนียมซัลเฟต) ที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของ*Bacillus* sp. BA-019 และสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

4. การศึกษาสมบัติทางกายภาพบางประการของโคพอลิเมอร์บางชนิดที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019