บทที่ 1

บทนำ

การอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมนับว่าเป็นสิ่งที่สำคัญมากในปัจจุบัน เนื่องจากจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นเป็นลำดับซึ่งก่อปัญหาเรื่องมลภาวะตามมา ทั้งในด้านของ ดิน น้ำ และอากาศ การที่ประชากรของมนุษย์ที่เพิ่มขึ้นก่อให้เกิดปัญหาการใช้ทรัพยากรณ์อย่างฟุ่มเฟือย ทำให้เกิดปัญหาสำคัญก็คือ ขยะเหลือทิ้งโดยเฉพาะขยะประเภทพลาสติกที่ได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น โพลีเอทธิลีน (polyethylene, PE) โพลีโพรพิลีน (polypropylene, PP) โพลีไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride, PVC) เป็นต้น มีอัตราการใช้สูงถึง 25 ล้านตันต่อปี (Lee และคณะ,1991) วัสดุเหล่านี้เป็นวัสดุที่มีความแข็งแรง ทนทาน มีน้ำหนักเบา ราคาไม่แพง ซึ่งเป็นข้อดีแต่ก็มีข้อเสียก็คือ ย่อยสลายยากอาจโดยใช้เวลาถึง 250-400 ปี ถึงไม่ย่อยสลายได้เลยในธรรมชาติและยังก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางอากาศเมื่อกำจัดโดยวิธีการเผาอีกด้วย (Verstraete และ Top,1992) ดังนั้นการกำจัดขยะพลาสติกจึงเป็นปัญหาสำคัญมาโดยตลอด การจัดการปัญหาขยะพลาสติกทำได้หลายวิธีดังนี้

การฝังดิน (sanitary landfill) เป็นวิธีที่นิยมเลือกใช้กันมากที่สุดสำหรับขยะมูลฝอยที่เหลือทิ้งจากบ้านเรือน โดยต้องเตรียมพื้นที่ดินว่างเปล่า และเตรียมหลุมที่มีขนาดใหญ่เพื่อรองรับขยะ จะต้องมีการเทคินปกคลุมทับถมให้หนาพอสมควร พื้นที่ที่เตรียมไว้จะต้องแน่ใจว่าไม่มีน้ำชะขยะมูลฝอยไหลผสมกับน้ำใต้ดินเพื่อให้เป็นไปตามหลักการสุขาภิบาล ปัญหาที่เกิดขึ้นจากวิธีการกำจัดขยะวิธีนี้คือเรื่องกลิ่น ไฟไหม้ หรืออาจเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคเนื่องจากมีแมลง และสัตว์เล็กๆมาคุ้ยเขี่ย ถ้าหากมีการจัดการไม่ดีพอ ปัญหาเรื่องการหาพื้นที่สำหรับใช้เป็นที่ฝังเพราะปริมาณขยะที่เพิ่มขึ้นตลอดเวลา (Nicholson, 1994) ตลอดจนพื้นที่ว่างเปล่าที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ลดน้อยลง วิธีนี้เป็นเพียงวิธีที่แก้ไขปัญหาระยะสั้นเท่านั้น

การเผา (incineration) การกำจัดขยะพลาสติกด้วยวิธีการเผานี้ มีหลายประเทศทั้งในเอเชีย และยุโรป ได้มีการพัฒนาวิธีการเผาขยะที่มีประสิทธิภาพขึ้นมา วิธีเผาทำได้โดย นำขยะพลาสติกมาแยกจากขยะอื่นๆแล้วนำมาบดให้ละเอียด เข้าสู่เตาเผาที่ออกแบบพิเศษ เพื่อให้ได้การเผาไหม้โดยสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 680-1100 องศาเซลเซียส แม้ว่าการเผาจะมีประสิทธิภาพแต่ก็ยังก่อปัญหาก๊าซพิษ เช่น ไฮโดรเจนไซยาไนด์ ไฮโดรคลอไรด์

คาร์บอนมอนอกไซด์ ไอของโลหะหนัก เป็นต้น นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายของวิธีการเผานี้ยังสูงอยู่มาก (Evans and Sikdar, 1990 ; Huffman และ Keller,1973)

การนำกลับมาใช้ใหม่ (recycling) สามารถแยกชนิดของพลาสติกที่ถูกใช้แล้วจัดจำแนกพลาสติกที่แตกต่างกันแต่ละชนิด แล้วนำมาล้างทำความสะอาด หลังจากนั้นก็นำมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อนำไปล้างด้วยสารเคมีให้ชิ้นพลาสติกสะอาดขึ้น ต่อจากนั้นก็นำไปหลอมโดยใช้ความร้อนอาจมีการเติมสารปรับปรุงคุณสมบัติหรือ สี เพื่อให้พลาสติกมีลักษณะเหมาะสมที่จะนำกลับไปใช้ใหม่ หรือเพื่อปิดบังสิ่งสกปรกที่ยังตกค้างอยู่ พลาสติกที่ได้จากวิธีการนี้มีคุณสมบัติของพลาสติกเปลี่ยนไป ตลอดจนสารที่ตกค้างนี้อาจมีพิษทำให้ไม่สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุบรรจุผลิตภัณฑ์ที่ใช้บริโภคได้ (Evans และ Sikdar, 1990) เพื่อความสะดวกในการแยกขยะพลาสติกที่กลับมาใช้ใหม่นั้น ได้มีการกำหนดสัญญาลักษณ์ SPI symbol เพื่อใช้บอกชนิดของพลาสติกนั้นๆ ข้อเสียของวิธีนี้คือ เนื่องจากต้องผ่านกระบวนการที่จะต้องปรับปรุงคุณสมบัติจึงต้องมีค่าใช้จ่ายเรื่องของสารเติมแต่ง ค่าใช้จ่ายจึงยังสูงอยู่ และวัสดุที่ได้จะสูญเสียคุณสมบัติที่ดีบางประการไป เช่น การทนความร้อน ความยืดหยุ่นของพลาสติก เป็นต้น

ในปัจจุบันมีความเป็นไปได้ที่จะหาวัสดุที่มีคุณสมบัติเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (degradable plastics) เพื่อที่จะแก้ปัญหาการกำจัดขยะพลาสติก นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้ศึกษาวิจัย เพื่อหาวัสดุที่ย่อยสลายได้ เช่น มีการผสมแป้งกับพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ให้มีคุณสมบัติเป็นพลาสติกที่มีส่วนที่ถูกย่อยสลายได้ การพัฒนาพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้นั้นพอจะแบ่งเป็นชนิดได้ดังนี้

1) พลาสติกที่ถูกสลายตัวโดยแสงอัลตร้าไวโอเล็ต (UV degradable plastic) เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีหมู่คาร์บอนิล (C=O) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีความไวสูงต่อแสง UV ทำให้เกิดการแตกตัวของสายพอลิเมอร์ทำให้พลาสติกกรอบ และแตกได้ เช่น พอลิสไตรีน (polystyrene, PS) หรือมีการเติมสารเติมแต่งชนิดที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำลายสายพอลิเมอร์เมื่อได้รับแสง UV (Brandl และคณะ, 1990)
2) พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีการใส่สารเติมแต่ง (additive based polymer) เป็นพลาสติกที่เมื่อหมดอายุการใช้งานก็จะเสื่อมสลายไปเอง ได้แก่ พอลิเอทธิลีน (polyethylene, PE) พอลิโพรไพลีน (polypropylene, PP) และพอลิสไตรีน (polystyrene, PS) ที่มีการใส่สารเติมแต่งธรรมชาติบางชนิดเช่น ข้าว ข้าวโพด

แป้ง และเซลลูโลส เป็นต้น (Evans และ Sikda, 1990 ; Raghavan, 1995) เมื่อพลาสติกเหล่านี้ถูกทิ้งในธรรมชาติ จุลินทรีย์จะย่อยสารเติมแต่งมีผลให้พลาสติกมี รูพรุน และพื้นที่ผิวมากขึ้น หลังจากนั้นโลหะหรือน้ำที่มีอยู่ใต้ดินจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นทำให้สายพอลิเมอร์ขาดและน้ำหนักโมเลกุลลดลง (Johnson และคณะ, 1993 ; Ramsay และคณะ, 1993)

3) พลาสติกซึ่งผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biopolymer) สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable) อย่างสมบูรณ์เกิด ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งไม่ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม พลาสติกซึ่งมีคุณสมบัติเหล่านี้ ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA) พอลิแลคไตด์ (polylactide, PLA) อลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) รวมถึงโคพอลิเมอร์ และอนุพันธ์ผสมของพอลิเมอร์เหล่านี้

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

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoate,PHA)

เป็นพอลิเอสเทอร์ที่จุลินทรีย์บางชนิดสร้างและสะสมภายในแกรนูล เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนซึ่งเปรียบเทียบได้กับไกลโคเจนที่สะสมในสัตว์ชั้นสูง หรือแป้งที่สะสมในพืช (Bloembergen และคณะ,1986) รวมทั้งยังใช้สำหรับการงอกของสปอร์ (sporulation) ใน *Bacillus* (Williumson และ Wilkinson, 1958) และการสร้างซีสต์ (encysment) ในจุลินทรีย์ *Azotobactor* (Dawes และ Senior,1973) การสร้างและสะสม PHA ในแบคทีเรียนั้นสามารถตรวจสอบเบื้องต้นได้โดยการย้อมด้วยสีซูดานแบล็ค บี(sudan black B) ไนล์บลู(nile blue) (Byrom,1994) หรือ มาลาไคท์ กรีน (malachite green) (Sun และ คณะ 1994) PHA มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับคุณสมบัติของ PP และ PE ดังตารางที่ 1 และยังสามารถนำมาขึ้นรูปได้ (Holmes, 1988) PHA มีข้อดีกว่า PP และ PE คือ สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่มีเอนไซม์ (esterase) และดีพอลิเมอเรส (depolymerase) ผลจากการย่อยสลาย ได้สารที่ไม่มีอันตราย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evan และ Sikdar,1990) นอกจากนี้ PHA ยังมีสมบัติที่เข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบสมบัติ ของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ (Lee, 1996)

ชนิดของพอลิเมอร์	อุณหภูมิหลอมเหลว (^{0}ซ)	โมดูลัสของยังส์ (GPA)	เปอร์เซ็นต์การยืดตัว (%)
P(3HB)	179	3.5	5
P(3HB-co-3HV)			
3 mol% 3HV	170	2.9	-
9 mol% 3HV	162	1.9	-
14 mol% 3HV	150	1.5	-
20 mol% 3HV	145	1.2	-
25 mol% 3HV	137	0.7	-
P(3HB-co-4HB)[b]			
3 mol% 4HB	166	-	45
10 mol% 4HB	159	-	242
16 mol% 4HB	-	-	444
64 mol% 4HB	50	30	591
90 mol% 4HB	50	100	1080
P(4HB)[c]	53	149	1000
P(3HHx-co-3HO)[d]	61	-	300
Polypropylene	170	1.7	400
Polyethylene-terephthalate	262	2.2	7300
Polystyrene	110	3.1	-

[a] ไม่มีข้อมูล

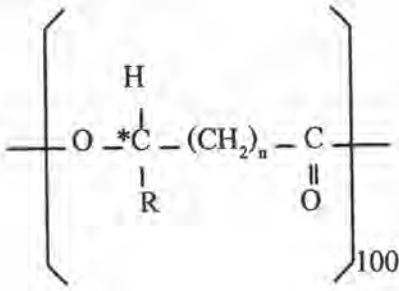
[b] Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)

[c] Poly(4-hydroxybutyrate)

[d] Poly(3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctatoate)

โครงสร้างของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ประกอบกันขึ้นจากโมโนเมอร์ในกลุ่มกรดไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์อีกตัวหนึ่ง ที่ตำแหน่งบีตาคาร์บอนหรือคาร์บอนตัวที่สามเป็นไครัลคาร์บอนซึ่งทุกๆ โมโนเมอร์แสดง R-configuration และการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์เป็นแบบหัวต่อหาง (head to tail configuration) เช่นเดียวกับ PP (Brandl และคณะ 1990)



* แสดงตำแหน่งบีตาคาร์บอน

n = 1	R = ไฮโดรเจน(H)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต) หรือ P(3HP)
	R = เมทธิล(CH_3)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB)
	R = เอทธิล(C_2H_5)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(3HV)
	R = โพรพิล(C_3H_7)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีคาโปรเอต) หรือ P(3HC)
	R = บิวทิล(C_4H_9)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต) หรือ P(3HH)
	R = เพนทิล(C_5H_{11})	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) หรือ P(3HO)
	R = โนนิล(C_9H_{19})	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเคคะโนเอต) หรือ P(3HD)
n = 2	R = ไฮโดรเจน(H)	สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(4HB)
n = 3	R = ไฮโดรเจน(H)	สารนี้คือ พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(5HV)

รูปที่ 1 โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Findlay และ White 1983)

PHA ที่พบแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ PHA ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียว เรียกว่า โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เช่น พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเรียกว่า poly(3-hydroxybutyrate) หรือ PHB ส่วน PHA ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิด เรียกว่าเฮทเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เช่น โคพอลิเมอร์ ได้

แก่ P(3HB-co-3HV) และ P(3HB-co-4HB) และเทอร์พอลิเมอร์(terpolymer) ได้แก่ P(3HB-co-3HV-co-4HB) เป็นต้น

การค้นพบพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท

เริ่มมีรายงานการค้นพบพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ตั้งแต่ปี 1926 โดย Lemoigne พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดแรกที่เป็นที่รู้จักคือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ PHB PHB เป็นหนึ่งในหลายชนิดของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ นอกจาก PHB แล้วยังมีพอลิเมอร์ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ กรด 3-ไฮดรอกซีชนิดอื่นๆอีก Wallen และ Rohedder ได้รายงานในปี 1974 ว่าในการสกัด activated sewage sludge ด้วยคลอโรฟอร์มนั้นพอลิเมอร์ที่สกัดได้ประกอบด้วย 3HB และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต(3HV) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า PHB สามารถละลายได้ในเอทธานอล ร้อน Findlay และ White (1983) พบ พอลิเมอร์สายสั้นที่มีคาร์บอนประกอบอยู่ด้วยกัน 11 ตัวประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV ซึ่งสกัดได้จากตะกอนจากน้ำทะเล (marine sediments)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย

เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างและสะสม PHA ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยเริ่มมีการค้นพบ PHB จากเชื้อ *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926) นับตั้งแต่นั้นก็มีการวิจัยค้นหาเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ De Smet และคณะ (1983) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* ในอาหารที่มี 50% (vol/vol) n-octane พบ granules ที่ประกอบด้วย poly(3-hydroxyoctanoate) โดยวิธี freeze-fracture electron Holmes(1988) ศึกษาการผลิต PHB จาก *A. eutrophus* และรายงานว่า *A. eutrophus* สะสม PHB ได้ถึง 80%(w/w) เมื่อใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน รายงานของ Brandl และคณะ (1989) แสดงให้เห็นว่า *Rhodospirillum rubrum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิต PHAs จาก n-alkanoic acid *Halobacterium mediterranei* สามารถสร้างและสะสม PHB ได้ 38%(w/w) เมื่อมีความเข้มข้นของเกลือแกง(NaCl) 15% (w/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Fernandez-Castillo และคณะ, 1986) Asenjo และ Suk(1986) รายงานว่า *Methylocystis parvus* ผลิต PHB เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมมีเธน(methane) คิดเป็นผลผลิต PHB ได้ถึง 67% ตามทฤษฎี (86 กรัมต่อ128 กรัมของมีเธน) *Rhizobium meliloti* สามารถสร้างและผลิตโคพอลิเมอร์ของ

ตารางที่ 2 แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่สามารถสร้างและสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้าง PHA	ปริมาณPHA (%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	เอกสารอ้างอิง
Rhizobium sp.	Na-glutamate	50	Tombolini และคณะ(1989)
Bacillus megaterium	glucose + valeric	18	Anderson และคณะ (1990)
Beijerinckia indica	glucose + valeric	20	
Derxia gummosa	glucose + valeric	12	
Pseudomonas sp.	methanol + valeric	11	
Methylobacterium sp.	methanol + valeric	10	
Pseudomonas oleovarans	glucose + valeric	2	
Alcaligenes eutrophus	glucose + valeric	60	
Alcaligenes faecalis	acetate + valeric	5	
Bacillus cereus	glucose + propionic	13	Ramsay และคณะ(1990)
Micrococcus halodenitrificans	glucose + propionic	21	
Pseudomonas cepacia	glucose + propionic	64	
Pseudomonas pseudoflava	glucose + propionic	43	
Alcaligenes latus	sucrose + propionic	53	
Alcaligenes eutrophus	glucose + propionic	43	
Hyphomicrobium methylovorum	methanol	12	Matsumoto และคณะ(1992)
Methylobacterium organophilum	methanol	7	
Metylobacterium fijisawaense	n-amyl alcohol	17	
Methylobacterium extorquens	methanol	29	
Xanthobacter autothrophicus	n-amyl alcohol	16	
Paracoccus denitrificans	n-amyl alcohol	53	
Pseudomonas lenoignei	n-amyl alcohol	17	
Pseudomonas oleovorans	n-amyl alcohol	2	
Chromobacterium violaceum	valerate	65	Steinbuchel และคณะ(1992)
Rhodobacter sphaeroides	palm oil mill effluent	60	Hassan และคณะ(1997)
Azotobacter salinestris	glucose + valeric	85	Page และคณะ(1997)
Methylobacterium sp.	lactose,whey	59	Yellore และ Desai(1998)
Azotobacter chroococcum	soluble starch	74	Kim และ Chang (1998)

P(3HB-co-3HV) คิดเป็น 58%(w/w)ของอาหารที่ใช้(Tombolini และ Nuti ,1989) แบคทีเรียอีกหลายชนิดมีความสามารถผลิต PHAs

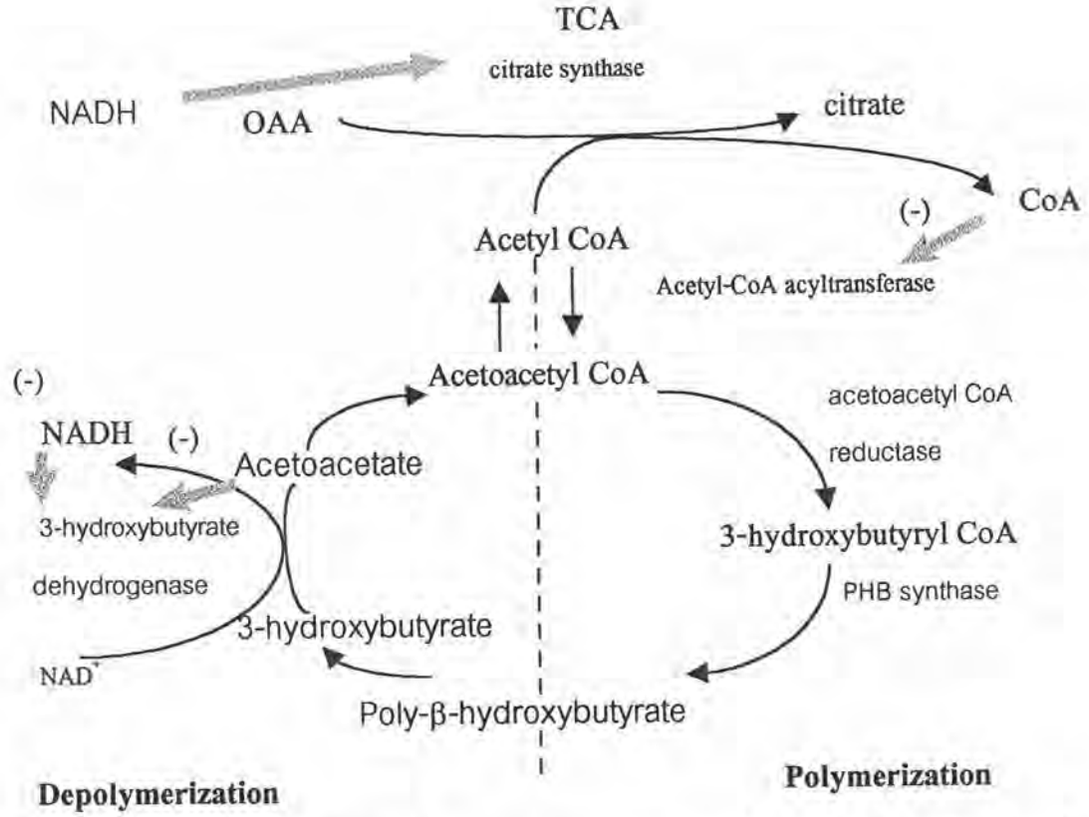
วิถีการสังเคราะห์ PHA ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus*

วิถีการสังเคราะห์ PHB

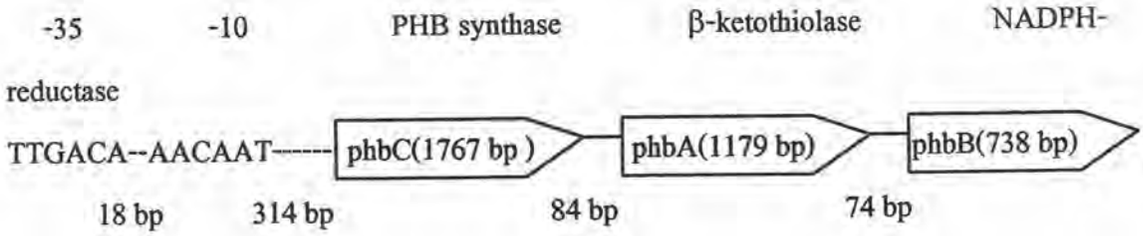
Byrom(1987) ได้ศึกษาวิถีการสังเคราะห์และการสลาย PHB รวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดมีวิถีการสังเค. าะห์ PHB ที่คล้ายกันโดยมีเอนไซม์สำคัญๆ สำหรับ เมตาบอลิสมของ PHB คือ อะซิทิล โคเอ เอซิลทรานส์เฟอเรส (acetyl-CoA acyltransferase) ซึ่งถูกยับยั้งได้โดย โคเอนไซม์เออิสระ (free coenzyme A) ปริมาณสูงๆ นั่นคือเมื่อมีการเจริญภายใต้ภาวะสมดุลย์ ทำให้ปริมาณโคเอนไซม์เออิสระ สูงเป็นผลให้การสังเคราะห์ PHB ถูกยับยั้ง แต่เมื่อใดภาวะการเลี้ยงมีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น N P Mg แต่ปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ ทำให้มีการสร้าง NADH มากพอที่จะยับยั้งเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrate synthase) ทำให้ อะซิทิล โคเอ (acetyl-CoA) มีปริมาณเพิ่มขึ้น และอีกจุดหนึ่งคือ โคเออิสระก็น้อยลง สำหรับการย่อยสลาย PHB เริ่มต้นด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยมีเอนไซม์ตัวที่สำคัญคือเอนไซม์ 3-hydroxybutyrate dehydrogenase และจะถูกควบคุมการทำงานโดย acetoacetate และ NADH ดังรูปที่ 2

ในเชื้อ *A. eutrophus* มียีนส์โครงสร้าง (structural gene) สำหรับการสังเคราะห์ PHA ซึ่งมีการวางตัวในซิงเกิลโอเปอรอน(single operon) คือ phbC-A-B เป็นตัวแปรรหัส (coding) สำหรับ PHA synthase, β-ketothiolase และ NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase ตามลำดับ ดังรูปที่ 3

วิถีการสังเคราะห์ PHB เริ่มต้นด้วยการเปลี่ยน acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) ที่เกิดจากซับสเตรตที่เป็นคาร์บอนที่เหมาะสม (น้ำตาล แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ หรือคาร์บอนไดออกไซด์) ซึ่งการสังเคราะห์ต่อไปจะใช้เอนไซม์ สามชนิด ต่อจากนั้น acetyl-CoAสองโมเลกุลรวมตัวกันโดยเอนไซม์ 3-ketothiolase (acetyl-CoA acetoacetyl transferase) แล้วปลดปล่อย coenzyme A อิสระออกมากลายเป็น acetoacetyl-CoA จากนั้น acetoacetyl-CoA จะถูก reduce เป็น D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA โดยเอนไซม์ NADPH-dependent acetoacetyl- CoA reductase ต่อจากนั้น D-(-)-3-hydroxybutyryl-CoA ก็จะถูก polymerization โดยเอนไซม์ P(3HB) synthase (polymerase)



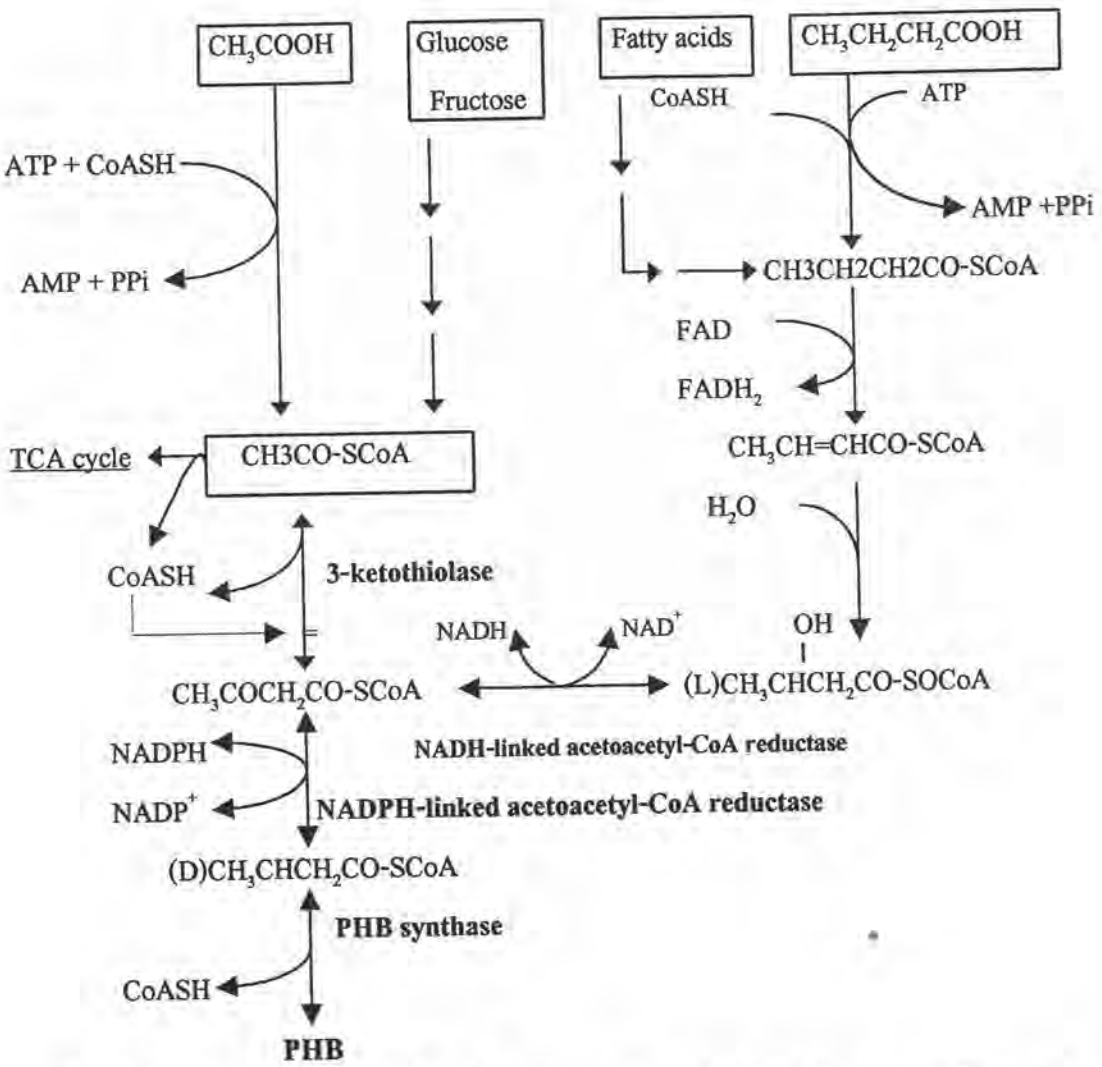
รูปที่ 2 วิถีการสังเคราะห์ และการสลาย PHB ภายใต้ภาวะคาร์บอน(แหล่งพลังงาน) ที่มากเกินพอ (Byrom 1987)



รูปที่ 3 โครงสร้างของ polyhydroxyalkanoate biosynthesis operon ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* (People. et.al. 1989 และSteinbuchel et.al. 1992)

เอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์ PHB คือ 3-ketothiolase ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วย coenzyme A ความเข้มข้นสูง เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะการเจริญสมดุลย์ ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนมากเกินพอ acetyl-CoA เข้าสู่วัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิกแอสิด (tricarboxylic acid, TCA cycle)

เพื่อสร้างพลังงาน และสร้าง กรดอะมิโน ผลทำให้โคเอนไซม์เออิสระมีความเข้มข้นสูง และการสังเคราะห์ PHB ถูกยับยั้ง แต่เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะการเจริญจำกัด (growth-limiting condition) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนอยู่มากเกินพอโดยจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น N P Mg ทำให้มี NADH มากเกินพอที่จะยับยั้ง ซิเตรทซินเทส(citrate synthase) และระดับ acetyl-CoA ก็เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลให้โคเอนไซม์เออิสระมีความเข้มข้นน้อยลง การยับยั้ง 3-ketothiolase โดย โคเอนไซม์เออิสระก็หยุดลง และ การสังเคราะห์ PHB ก็จะเริ่มต้น



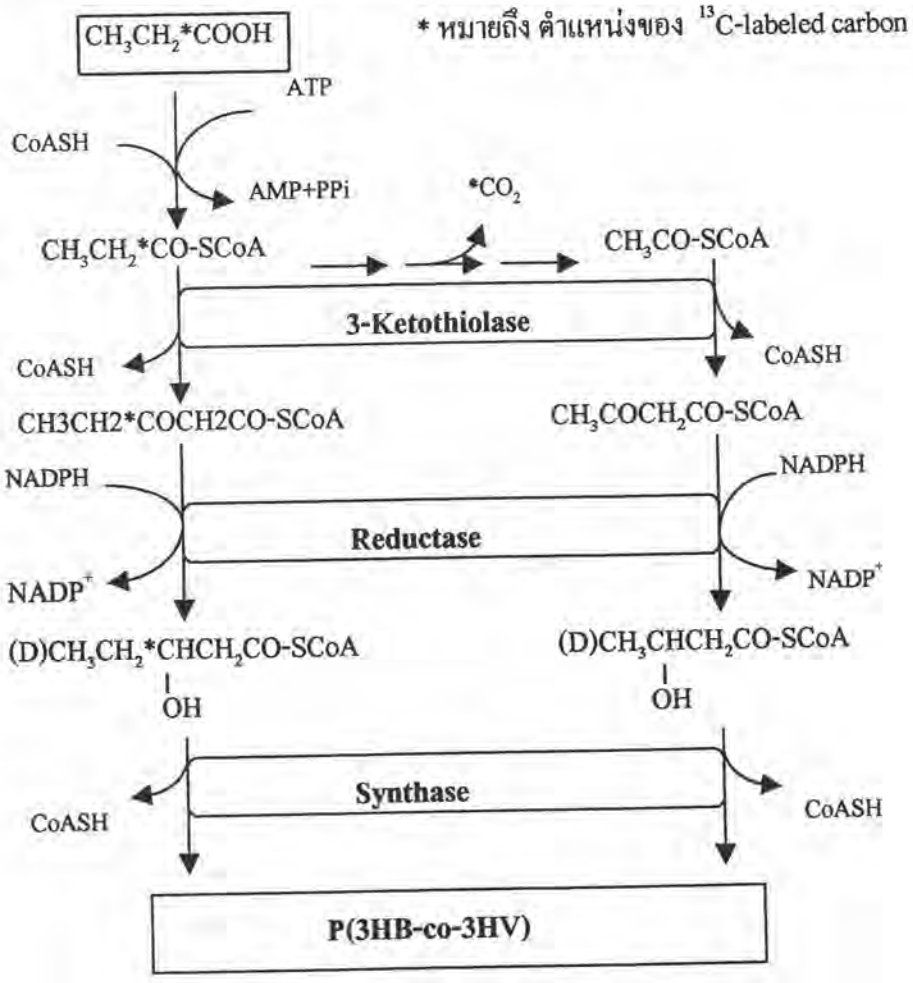
รูปที่ 4 วิถีการสังเคราะห์ PHB โดยเชื้อ *A. eutrophus* เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (Doi 1990)

Doi et al. (1988)ได้ศึกษาวิถีการสังเคราะห์ PHB โดยติดฉลาก ^{13}C-labeled butyrates เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* พบว่าวิถีการสังเคราะห์มีความแตกต่างบางประการ (รูปที่ 4) เมื่อเปรียบกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล คือเอนไซม์ 3-ketothiolase ไม่มีบทบาท

เนื่องจาก butyrate ไม่ต้องเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหลักไปเป็นอะซิติล โคเอ เพื่อรวมตัวเป็น PHB

วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV)

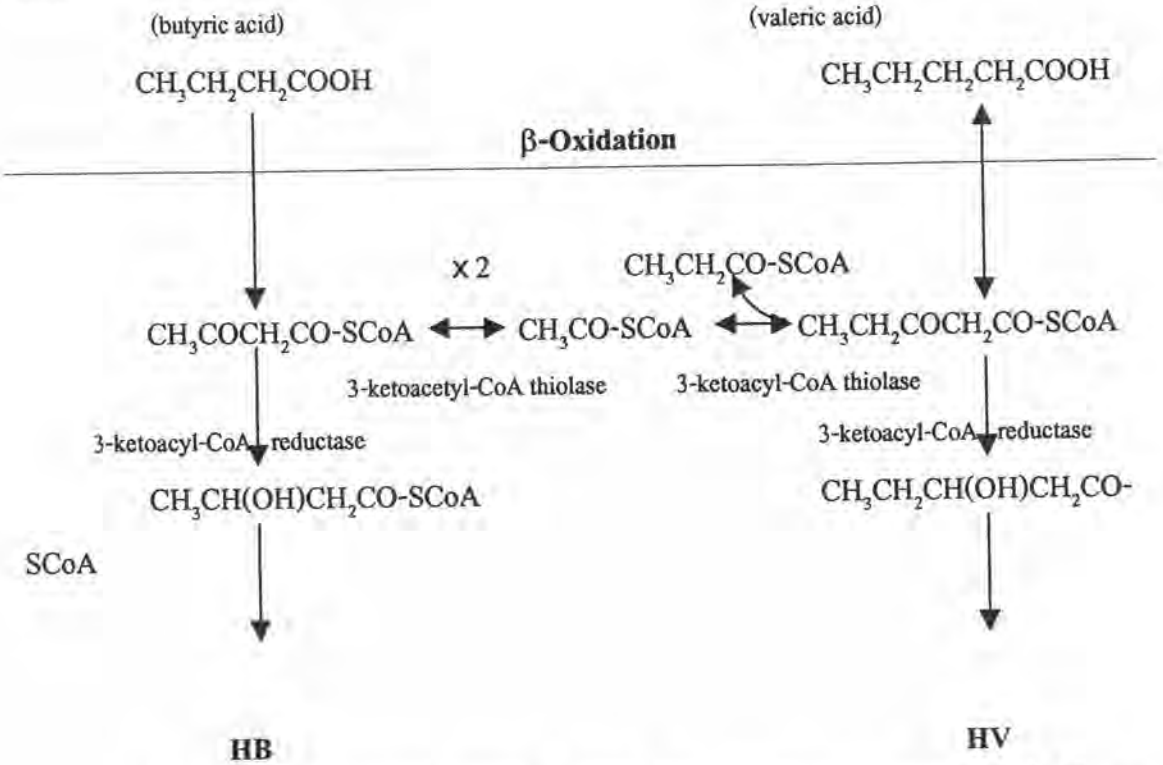
Doi และคณะ (1987) ได้ศึกษาวิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-40%3HV) ในเชื้อ *A. eutrophus* โดยติดฉลากที่คาร์บอนตำแหน่งแรกในโพรพิโอเนต [1-^{13}C]CH_3CH_2COOH (10%^{13}C) จากการศึกษาพบว่า ^{13}C-labeled carbonyl carbon ของโพรพิโอเนต เลือกที่จะเข้ารวมตัวกับ methine carbon ของ 3HV unit ซึ่งไม่มีนัยสำคัญกับการติดฉลากของคาร์บอนตัวอื่นทั้ง 3HB หรือ 3HV units เมื่อโพรพิโอเนตถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA ถูกสร้างจาก acetyl-CoA สองโมเลกุล ซึ่งสร้างจากการจำกัด ^{13}C-



รูปที่ 5 วิถีการสร้าง P(3HB-co-40%3HV) โดยเชื้อ *Alcaligenes euthophus* เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกที่ทำการติดฉลากด้วย ^{13}C-labeled carbonyl (Doi 1990)

labeled carbon จาก propionyl-CoA และ D(-)-3-hydroxyvaleryl-CoA ได้ถูกสร้างโดยปฏิกิริยาของ propionyl-CoA กับ acetyl-CoA หลังจากนั้นการรวมตัวของ 3HB และ 3HV units จะเป็นแบบสุ่มตามการทำงานของเอนไซม์ P(3HB) synthase (รูปที่ 5)

เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก กรดอินทรีย์จะถูกเมตาโบไลซ์เป็น 3-ketovaleryl CoA และเปลี่ยนเป็น 3-hydroxyvaleryl-CoA โดยเอนไซม์ 3-ketoacyl-CoA recuctase ในขณะที่ 3-ketovaleryl-CoA บางส่วนจะถูกเมตาโบไลซ์โดยเอนไซม์ 3-ketoacyl-CoA thiolase กลายเป็นอะซิติลโคเอ (C_2) และ โพรพิโอนิลโคเอ (C3) ซึ่งอะซิติลโคเอ 2 โมเลกุล จะถูกเมตาโบไลซ์ต่อเป็น 3HB โดยเอนไซม์ 3-ketoacyl-CoA thiolase ดังนั้นเมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวจึงไม่ได้โฮโมพอลิเมอร์ของ P(3HV) ดังแสดงในรูปที่ 6 Doi และคณะ(1988) ได้รายงานว่าเมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวจะผลิตเป็น P(3HB-co-97%3HV) โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* H16



รูปที่ 6 วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes eutrophus* เมื่อใช้กรดบิว ทิริก และกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน (Ishihara และคณะ,1996)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *Alcaligenes*

เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถ สร้าง และสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ แต่ความสามารถในการสร้างและสะสมนั้นไม่เท่ากัน โดยเฉพาะเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ซึ่งสามารถเจริญได้ง่าย สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวเทอเรตได้ในปริมาณสูงเก็บไว้ภายในเซลล์ภายใต้ภาวะการจำกัดสารอาหารที่จำเป็น และสะสม PHB ได้ในปริมาณมาก (สูงที่สุดถึง 80 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนเช่น กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) ลงในสูตรอาหาร พอลิเมอร์ที่ได้จะประกอบด้วยหน่วยโมโนเมอร์ ของ 3HB และ 3HV (Holmes, และคณะ,1983 และ 1985) Respaske และคณะ(1976) ได้ศึกษาปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Alcaligenes eutrophus* พบว่าการจำกัดปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสเฟต แมกนีเซียม และซัลเฟต จะมีผลต่อการกระตุ้นการผลิต PHB ต่อมา Carter และ Dawes (1979) ได้ศึกษาผลการจำกัดออกซิเจน และ อัตราการเจือจาง ในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (continuous cultivation) ต่อการสร้าง PHB โดยเชื้อ *Azotobacter beijerinckii* พบว่าการแคตาบอไลต์กลูโคส และการเจริญ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ในวิถี Entner-Doudoroff ลดลงเมื่อเพิ่มการให้ออกซิเจน ขณะที่เอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase ไม่มีผลกระทบเลย ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β-ketothiolase และ acetoacetyl-CoA reductase ลดลงทำให้การสังเคราะห์ PHB ต่ำลง Lefebvre และคณะ (1997) ได้รายงานวิธีการเลี้ยง *A. eutrophus* เพื่อผลิต P(3HB-co-3HV) ในการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch cultivation) เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส และเกลือโพรพิโอเนต การเลี้ยงได้จำกัดปริมาณไนโตรเจนและออกซิเจนในช่วงเวลาของการสะสมโคพอลิเมอร์ ผลปรากฏว่าเมื่อรักษาระดับค่าออกซิเจนละลายไว้อยู่ในช่วงระหว่าง 1 และ 4 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัวของอากาศ ผลที่ได้คือปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักน้อยไม่มีผลต่อผลผลิต (yield) ของโมโนเมอร์ 3HB ที่สร้างมาจากกลูโคส แต่มีผลต่อการเปลี่ยนโพรพิโอเนตไปเป็นโมโนเมอร์ของ 3HV โดยเพิ่มขึ้นเป็น 2-3 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (การละลายออกซิเจน 50-70 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัวของอากาศ) ส่วนผลรวมของกระบวนการหมักที่ค่าการละลายของออกซิเจนต่ำๆ จะให้ค่าของ PHA ค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากความต้องการออกซิเจนของปฏิกิริยา decarboxylation ของ propionyl-coenzymeA (CoA) ไปเป็น acetyl-CoA Doi และคณะ 1986 ได้ศึกษาผลของสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆโดยใช้ *Alcaligenes eutrophus* H16 จากการศึกษาพบว่ากรดโพรพิโอนิก และ กลูโคส ในอาหารมีผลต่อปริมาณหน่วยของโมโนเมอร์ของ 3HV ที่ประกอบอยู่ในพอลิเมอร์ ถ้าในสูตรอาหารที่มีกรดโพรพิโอ

นิกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวหน่วยของโมโนเมอร์ที่ได้เป็น 43 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณพอลิเมอร์โดยรวมของแบคทีเรียยังต่ำอยู่ (35% ต่อน้ำหนักแห้ง) ส่วนโคซับสเตรตที่ประกอบด้วยกลูโคส และกรดบิวทิริก (butyric acid) ทำให้ให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้เป็น PHB เท่านั้น (Holmes และคณะ, 1983 และHolmes, 1985) เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* สามารถใช้ กรดวาเลอริก (valeric acid) เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวเมื่อผลิตโคพอลิเมอร์ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ HV ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (Doi และคณะ 1987) และเมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นโคสับสเตรทร่วมกับกลูโคส ปรากฏว่าสามารถให้โคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ HV ในสัดส่วนที่สูง เมื่อใช้ กลูโคส และกรดโพรพิโอนิก เป็นแหล่งคาร์บอนโดยเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็น *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599(Haywood และคณะ 1989) นอกจากนี้แล้วการศึกษาการสะสมโคพอลิเมอร์ของ 3-hydroxybutyrate และ 3-hydroxyvalerate พบว่าเชื้อ *A. eutrophus* สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่มี 4-hydroxybutyrate และ 5-hydroxyvalerate monomers ซึ่ง Doi และคณะได้แสดงให้เห็นว่าโมโนเมอร์เหล่านี้ได้เป็นส่วนประกอบอยู่กับโคพอลิเมอร์ และเทอพอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *A. eutrophus* ที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ หรือแหล่งคาร์บอนผสม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตจาก *A. eutrophus* ATCC 17699 จากแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน (Doi ,1990)

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	PHA (%w/w)	องค์ประกอบของพอลิเมอร์(โมล%)			
			3HB	4HB	3HV	5HV
$CH_3(CH_2)_3COOH$	20	36	10	-[a]	90	-
$Cl(CH_2)_3COOH$	18	27	89	11	-	-
$HO(CH_2)_3COOH$	16.5	300	67	33	-	-
$HO(CH_2)_3COOH$	9.6	43	82	18	-	-
$CH_3(CH_2)_2COOH$	8					
$HO(CH_2)_4OH$	20	8	75	25	-	-
$Cl(CH_2)_4COOH$	15	29	63	37	-	-
$CH_3(CH_2)_2COOH$	5					
$O(CH_2)_3CO$	20	21	83	17	-	-
$O(CH_2)_3CO$	10	65	76	24	-	-
$CH_3(CH_2)_2COOH$	10					
$Cl(CH_2)_4COOH$[b]	20	1	24	-	24	52
$Cl(CH_2)_4COOH$[b]	5	19	26	-	65	9
$CH_3(CH_2)_3COOH$	15					
$HO(CH_2)_3COOH$	17.5	18	32	45	23	-
$CH_3(CH_2)_3COOH$	2.5					

[a] ไม่มีการรายงาน [b] ข้อมูลสำหรับ *A. eutrophus* NCIMB 11599

กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักแบบแบช (Batch culture)

เป็นกระบวนการหมักที่ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ภายในระบบปิด การเลี้ยงเชื้อนิยมทำในขวดเขย่าหรือในถังหมัก โดยใช้สารอาหาร และภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโต สารอาหารที่ใช้ในระบบมีปริมาณจำกัด เพราะไม่มีการเติมสารอาหาร ภาวะภายในระบบมีการเปลี่ยนแปลง สารอาหารถูกใช้หมดไป ความเป็น

กรดด่างเปลี่ยนไป มีการสะสมสารพิษ เป็นต้น รูปแบบการเจริญสามารถแบ่งออกเป็นดังนี้ (Aiba และคณะ, 1973 ; Scragg, 1991)

1) ระยะการพักตัว (lag phase) หลังจากการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ ระยะนี้จะไม่ค่อยเห็นการเปลี่ยนแปลงของการเจริญช่วงของระยะการพักตัว จะขึ้นอยู่กับเชื้อว่ามีความสามารถมากหรือน้อยที่จะปรับตัวเมื่อเจริญในสิ่งแวดล้อมใหม่ และเริ่มสังเคราะห์สารที่จำเป็นเช่น สารพันธุกรรม โปรตีนต่างๆโดยเฉพาะเอนไซม์ สำหรับใช้ในการเจริญ และสังเคราะห์สารใหม่ๆ เพื่อใช้ในการเจริญ ดังนั้นถ้าอาหารและสิ่งแวดล้อมมีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์ ช่วงเวลาการพักตัวก็จะสั้นหรือไม่มีเลย ช่วงนี้อาจยาวนานถ้าส่วนประกอบของอาหารแตกต่างจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกล้าเชื้อมาก

2) ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential หรือ log phase) หลังจากระยะการพักตัวแล้วอัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเริ่มคงที่ ภายใต้ภาวะนี้การสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์เพิ่มขึ้น ด้วยอัตราคงที่ ดังนั้นจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ และต่อเนื่องอยู่ช่วงหนึ่ง ถึงแม้ว่าช่วงนี้จะเป็นช่วงของการเจริญที่สมดุลย์ แต่สิ่งแวดล้อมของเซลล์ก็มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน เนื่องจากมีการใช้สารอาหาร และการสะสมสารผลิตภัณฑ์

3) ระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) เป็นช่วงท้ายสุดของการเจริญแบบทวีคูณ ซึ่งอัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งถึงศูนย์ ในช่วงระยะการเจริญแบบคงที่นี้น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มคงที่ และไม่มีการเจริญ ซึ่งจริงๆแล้วการเจริญอาจมีบ้างแต่จะมีเท่ากับการตายของเซลล์ ดังนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งจึงสมดุลย์กัน เหตุที่เซลล์หยุดการเจริญเพราะว่าสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญหมดลง การสะสมสารพิษมีมากขึ้นตลอดจนการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม เหตุที่เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ได้เนื่องจากมีการใช้สารที่เก็บสะสมภายในเซลล์เป็นแหล่งอาหาร หรืออาจใช้พัฒนาต่อไปเพื่อให้ทนต่อความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมได้ ในช่วงการเจริญแบบคงที่อาจตามด้วยระยะการตาย (decline phase) ซึ่งอัตราการตายเพิ่มมากกว่าอัตราการเจริญ เรียกช่วงระยะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นว่า วัฏจักรการเจริญ (growth cycle)

การเจริญของจุลินทรีย์ เพิ่มขึ้นจะเป็นสัดส่วนกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) เมื่อเทียบกับปริมาณเซลล์เริ่มต้น ในช่วงระหว่างการเจริญแบบทวีคูณของจุลินทรีย์ น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าใช้เวลา t ทำให้ได้ความสัมพันธ์ดังนี้ (Scragg, 1991)

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

เมื่อ

n = จำนวนการเพิ่มเป็นสองเท่า (number of doublings)

t = เวลา (ชั่วโมง)

t_d = เวลาที่ใช้เพิ่มจำนวน (ชั่วโมง)

มวลชีวภาพที่เกิดขึ้นหลังจากเวลา 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

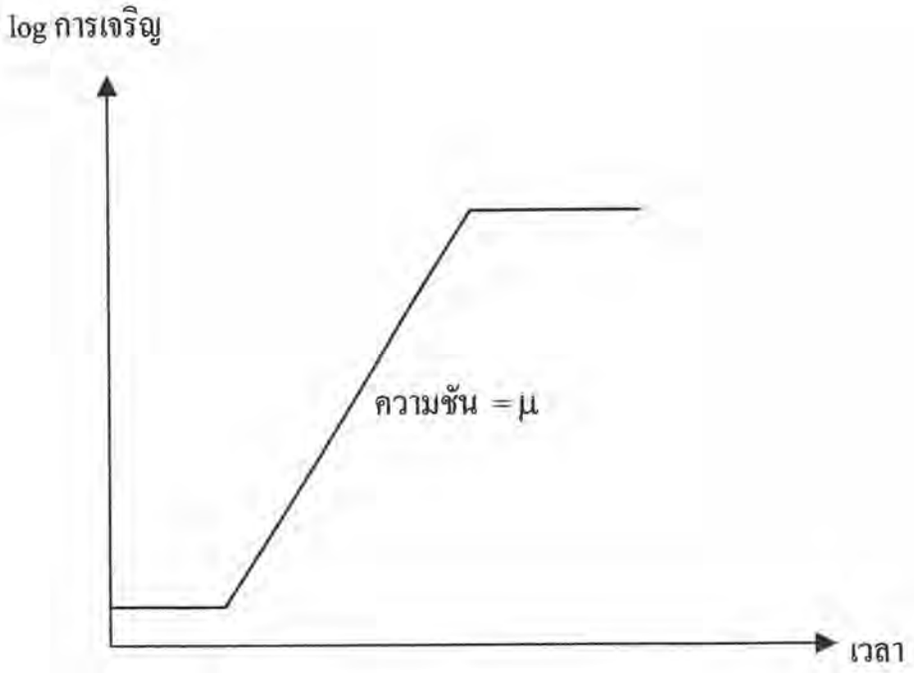
X_t = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพ ณ เวลา t (กรัมต่อลิตร)

X_0 = ความเข้มข้นของมวลชีวภาพเริ่มต้น (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)



รูปที่ 7 กราฟแสดงการหาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ)

ถ้าต้องการหาอัตราการเจริญจำเพาะที่เวลาใดๆในช่วงระหว่างการเจริญสามารถหาได้จาก

น้ำหนักเซลล์แห้งที่สะสม = เซลล์เจริญ - เซลล์ออก - เซลล์ตาย

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

เมื่อ F = อัตราการไหลออกของอาหาร (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรของอาหาร (ลิตร)

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

เซลล์ไม่มีการออกจากระบบ และ α >>> μ สามารถเขียนสมการใหม่คือ

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

การสร้างสารผลิตภัณฑ์

ความสำคัญของผลผลิตมวลชีวภาพต่อสารอาหาร และผลผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร ($Y_{x/s}$ และ $Y_{p/s}$) คือพารามิเตอร์ที่บอกถึงประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารอาหารไปเป็นมวลชีวภาพหรือเป็นสารผลิตภัณฑ์ โดยสามารถอธิบายเป็นมวลชีวภาพ หรือมวลของสารผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นต่อสารอาหารที่ใช้ไป ดังนี้

$$\frac{dX}{dt} = -Y_{x/s} \cdot \frac{dS}{dt} \qquad (7)$$

และ

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{p/s} \cdot \frac{dS}{dt} \qquad (8)$$

ค่าผลผลิต (yield) สามารถหาได้โดยการหาปริมาณมวลชีวภาพรวม หรือมวลของสารผลิตภัณฑ์ และสารอาหารที่ใช้ไป

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

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

กระบวนการหมักแบบเฟดแบช (Fed batch culture)

วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชเริ่มต้นใช้ในการผลิตยีสต์ประมาณปี 1900 (Brown 1990) สำหรับควบคุมการเจริญของ *Saccharomyces cereviseae* ในการเลี้ยงแบบแบชโดยใช้มอลท์เป็นซับสเตรต การผลิตยีสต์มีปัญหาอยู่สองประการคือข้อแรก ถ้าความเข้มข้นของมอลท์สูงเกินไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้มีเอธานอลเกิดขึ้นแทนการผลิตเป็นมวลชีวภาพ ประการที่สองคือถ้าความเข้มข้นของมอลท์ถูกควบคุมให้น้อยที่สุด การเจริญของยีสต์ก็จะถูกจำกัด ปัญหานี้ได้ถูกแก้โดยการหาวิธีควบคุมการเติมอาหารให้พอเหมาะกับการเจริญ มีผู้ได้ให้คำจำกัดความของการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชว่าเป็นกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหารที่จำเป็นอย่างต่อเนื่องแล้วหยุด หรือใส่เป็นครั้งคราว และไม่มีการดึงเอาสารผลิตภัณฑ์ออกจากระบบจนกว่าสิ้นสุดการหมัก (Yoshida และคณะ 1973)

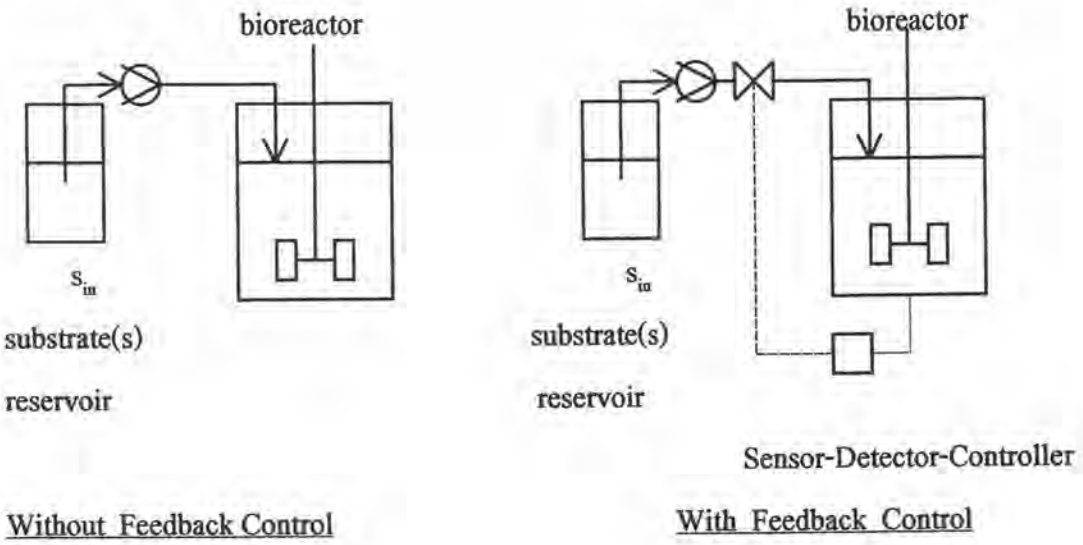
วิธีการควบคุมสำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช

วิธีการที่จะใช้ควบคุมการเลี้ยงแบบเฟดแบชเพื่อง่ายในการใช้งานมีการแบ่งไว้เป็นสองกลุ่มหลัก คือ with feedback control และ without feedback control ดังรูปที่ 8 การเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชจึงอาจมีการเรียกชื่อแตกต่างกัน บางครั้งเรียกว่า "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 ซึ่งเกี่ยวกับ ซับสเตรต เช่น การละลายของออกซิเจน อัตราส่วนของการหายใจ (เช่น CO_2/O_2) และ ความเป็นกรดด่าง

direct feedback control เป็นวิธีการติดตามความเข้มข้นสารอาหารในการเลี้ยงเชื้อโดยตรงโดยเฉพาะซับสเตรตสามารถรักษาให้คงที่ หรือสามารถแปรผันเพื่อรักษาเข้มข้นให้



รูปที่ 8 แผนภาพการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช (Yamane และ Shimizu 1984)

พอเหมาะ และการควบคุมการเติมอาหารระบบ with feedback controlสามารถจัดการให้เป็นระบบเปิด (open-loop system) หรือแบบปิด (closed-loop system)

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

ข้อได้เปรียบของวิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบช (Brown 1990)

1) สามารถใช้สารที่มีผลยับยั้งการเจริญ เช่น เอทธานอล กรดอินทรีย์ สารประกอบอโรมาติกเป็นซับสเตรตได้

2) เพิ่มการผลิตมวลชีวภาพ สามารถให้มวลชีวภาพได้มากกว่าการเลี้ยงแบบแบช โดยเฉพาะการผลิตที่เป็น growth-associated products สามารถเพิ่มปริมาณได้สูงขึ้นมาก

3) การผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งมีการผลิตไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non growth-related production) เช่นผลิตสารเมื่อจุลินทรีย์เริ่มเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบคงที่ ในกรณีนี้อัตราการเติมอาหารสามารถควบคุมในช่วงเริ่มต้นให้ผลิตมวลชีวภาพสูง หลังจากนั้นเมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่ช่วงการเจริญแบบคงที่ และเจริญช้าลง จัดการเติมอาหารให้เพียงพอสำหรับเป็นพลังงานเพื่อรักษากิจกรรมของเซลล์ไว้ขณะที่การสร้างสารผลิตภัณฑ์กำลังเกิดขึ้น

4) ไม่เกิด catabolite repression

5) ลดความหนืดของอาหาร (เช่น การผลิต dextran และ xantan gum)

6) ไม่เกิดปัญหาการปนเปื้อน การกลายพันธุ์ และความไม่คงตัวของพลาสมิด ซึ่งพบในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

ข้อเสียเปรียบของวิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบช

1) เครื่องมือของการเลี้ยงแบบ feedback control มีราคาแพง

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

3) ต้องการผู้มีทักษะมากสำหรับการปฏิบัติงาน

การเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชเป็นการเลี้ยงแบบการเติมอาหารแบบต่อเนื่อง ซึ่งสามารถทำการเลี้ยงได้สองแบบ คือ แบบปริมาตรไม่คงที่ และแบบปริมาตรคงที่ (Scragg 1991)

แบบปริมาตรไม่คงที่

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu XV - F_1X \qquad (11)$$

เมื่อ $\frac{dV}{dt} = F_0-F_1$ และ อัตราการเจือจาง $D_0 = F_0\ (h^{-1})$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - \frac{F_0}{V})X$$

$$= (\mu - D_0)X \qquad (12)$$

เมื่อการเจริญมีการจำกัดสารอาหาร และ $S_1 >>> S_0$ ดังนั้น

$$X \approx Y_{x/s} \text{ และ } \frac{dX}{dt} \approx 0$$

เมื่ออยู่ในภาวะ quasi-steady state $\mu \approx D$

ถ้า $F_0 > F_1$ เนื่องจาก μ ลดลงตามเวลา แต่ถ้า $F_0 = F_1$ ซึ่งเป็น chemostat condition (μ คงที่)

สำหรับสารอาหารที่จำกัดการเจริญ

$$\frac{d(SV)}{dt} = F_0S_R - \frac{\mu XV}{Y_{X/S}} - F_1S \qquad (13)$$

$$\frac{dS}{dt} = D_0(S_R - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \qquad (14)$$

เมื่อ $S_1 >> S$ ดังนั้น $\frac{dS}{dt} \approx 0$

สามารถเขียนสูตรให้ง่ายขึ้นคือ

$$\frac{F_0}{V} = \frac{\mu X}{Y_{X/S}(S_R-S)} \qquad (15)$$

เมื่อ

F_0 = อัตราการเติมอาหาร (ลิตรต่อชั่วโมง)

V = ปริมาตรของอาหารในถังหมัก (ลิตร)

$Y_{X/S}$ = ปริมาณเซลล์ที่ถูกสร้างขึ้นต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป

S_R = ความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมลงไป (กรัมต่อลิตร)

S = ความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นในถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

แบบปริมาตรคงที่

การเลี้ยงเชื้อในระบบให้ปริมาตรคงที่ทำได้โดยเติมอาหารที่เป็นก๊าซ ของเหลว หรือของแข็ง ถ้าการเลี้ยงเป็นแบบที่มีการจำกัดสารอาหารให้คงที่ที่อัตรา G (กรัมต่อลิตร) และปริมาตรของอาหารเปลี่ยนแปลงน้อยมาก อัตราการเจริญเมื่ออาหารจำกัดคือ

$$\frac{dX}{dt} = GY_{X/S}$$

ถ้า $\frac{dX}{dt} = \mu X$

ดังนั้น

$$\mu = \frac{GY_{X/S}}{X} \qquad (16)$$

อัตราผลผลิต (productivity)

อัตราผลผลิตหมายถึงปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยเวลาของการหมัก

ความสำคัญของการเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเซลล์สูง คือสามารถที่จะผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ปริมาณสูง ลดปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือขนาดของถังหมักให้เล็กลง ซึ่งทำให้ขั้นตอน downstream ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักด้วย วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบชเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณเซลล์สูง Suzuki และคณะ(1986) ได้เลี้ยง *Protomonas extorquens* ในอาหารที่มี

เมทธานอล เพื่อศึกษาการผลิต PHB จากการศึกษาพบว่าเมื่อมีการเติมสารอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณน้อยๆ เพื่อคงรักษากิจกรรมของเซลล์ในการผลิต PHB ผลคือทำให้อัตราผลผลิตสูงขึ้น เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการหมักลดลงจาก 175 ชั่วโมง เป็น 121 ชั่วโมง Lee และ Chang (1993) ได้เลี้ยง recombinant *E. coli* W ในอาหาร R medium ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน การเลี้ยงเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสามารถใช้กลวิธีการเติมอาหารแบบง่าย คือทำการเติมอาหาร (ซูโครส และ $MgSO_4 . 7H_2O$) เมื่อความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นวิธีการเลี้ยงแบบ pH-stat fed-batch ผลการวิจัยพบว่า recombinant *E. coli* W ได้ให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 124.6 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้น PHB เท่ากับ 34.3 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 48 Yamane และคณะ (1996) ได้ศึกษาการเจริญของ *Alcaligenes latus* โดยเลี้ยงเชื้อแบบ pH-stat fed-batch ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนผลการวิจัยพบว่าสามารถเพิ่มอัตราผลผลิตของ PHB เนื่องจากสามารถเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเซลล์สูง และเวลาการเลี้ยงเชื้อสั้น ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้ปริมาณกล้าเชื้อในการเลี้ยงสูง ได้ความเข้มข้นเซลล์ 142 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น PHB เท่ากับ 68.4 กรัมต่อลิตร ในเวลา 18 ชั่วโมง

การผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม

ในระดับอุตสาหกรรมมีความสนใจในการผลิตวัสดุโคพอลิเมอร์มากโดยเฉพาะ P(3HB-co-3HV) เนื่องมาจากความสามารถที่ย่อยสลายได้เองในธรรมชาติ มีคุณสมบัติหลายประการ ใกล้เคียงกับพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี และคุณสมบัติเป็นสารที่สามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตโดยไม่มีการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย จึงมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมโดยที่บริษัท ZENECA Bio products เป็นบริษัทแรกที่ผลิตผลิตภัณฑ์จาก PHA ออกมาในรูปของ PHB และ P(3HB-co-3HV) โดยเชื้อ *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 2,000 ความต้องการพลาสติกที่สามารถย่อยสลายเองได้ในธรรมชาติจะมีสูงถึง 1.4 ล้านตันต่อปี (Lee 1996) ซึ่งจะเป็นการคิดแก้ปัญหาขยะที่เกิดจากพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีได้ทางหนึ่ง

ปัญหาในการผลิตพลาสติกชนิด PHA ในระดับอุตสาหกรรมนั้นคือยังมีราคาค่อนข้างสูง เนื่องมาจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ มีราคาแพง อัตราการผลิตยังต่ำ และขั้นตอนในการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง (Eggink และคณะ 1992) ในขั้นตอนการผลิตเพื่อให้ได้อัตราผลผลิตที่สูงขึ้นสามารถใช้วิธีการหมักที่มีประสิทธิภาพ โดยการเลี้ยงแบบ เฟดแบช ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณของ PHA (กรัมต่อลิตร) ได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบอื่นๆ

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ในบรรดาพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้นั้น PHA เป็นพลาสติกที่น่าสนใจมาก เพราะมีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี และยังสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ อีกทั้งการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิต PHA มีหลายด้านทั้งทางสรีรวิทยา ทางพันธุศาสตร์ และชีววิทยาระดับโมเลกุล ทำให้เกิดการพัฒนาการผลิต PHA ให้ได้โมโนเมอร์ชนิดใหม่ๆ ซึ่งมีคุณสมบัติ และการย่อยสลายในธรรมชาติ รวมทั้งมีความเหมาะสมต่อการใช้งานมากขึ้น มีความเป็นไปได้ในการผลิตโคพอลิเมอร์ชนิดนี้โดยมีต้นทุนการผลิตต่ำลง และสามารถนำมาทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ในปัจจุบัน ดังนั้นผู้วิจัยกลุ่มนี้จึงมีการศึกษากันมาอย่างต่อเนื่อง อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ได้คัดเลือก *Alcaligenes* sp. A-04 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB เมื่อใช้ฟรักโตสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยผลิต PHB ได้ปริมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อปรับปรุงวิธีการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าโดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนในอาหาร MSM สามารถผลิต PHB เพิ่มขึ้นเป็น 49 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ชนัญ ผลประไพ (2537) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลาย ความเป็นกรดด่าง อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ อุณหภูมิ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นฟรักโตสปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิต PHB เพิ่มขึ้นเป็น 79 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (7.54 กรัมต่อลิตร) แต่เนื่องจาก PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งซึ่งมีสมบัติที่แข็งและเปราะ จึงมีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้งาน ดังนั้นในขณะเดียวกันผู้วิจัยกลุ่มนี้จึงมีความสนใจในการผลิตเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ ซึ่งมีสมบัติด้านต่างๆดีกว่าโฮโมพอลิเมอร์ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้มากขึ้น อัญชนา ศุรติขจร (2537) ได้รายงานการสังเคราะห์ และสะสมโคพอลิเมอร์จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ใน

ระดับขวดเขย่าพบว่าสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดยใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายกลุ่ม ได้แก่ น้ำตาล กรดอินทรีย์ น้ำมันพืช และแอลกอฮอล์ ชนิดต่างๆ โดยมีสัดส่วนโมโนเมอร์ 3HV ที่ได้สูงสุด เท่ากับ 0-90 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อใช้กรดอินทรีย์ (กรดวาเลอริก) เป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ รวมทั้งจากการศึกษาค้นคว้า ทำให้ทราบว่าโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ ที่น่าสนใจมากกว่าชนิดอื่นๆ เนื่องจากโคพอลิเมอร์ชนิดนี้มีสมบัติด้านต่างๆทั้งทางกายภาพ เคมี และเชิงกลดีกว่า PHB และเทอร์พอลิเมอร์ ทำให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆได้มาก ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต ให้ได้สูงขึ้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) โดยเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูง ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. เตรียมกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่เหมาะสม สำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

2. ศึกษาภาวะ และปริมาณแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ และการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดยศึกษาด้วยการเลี้ยงแบบแบช ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3. เพิ่มผลผลิตของการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบชในถังหมักขนาด 5 ลิตร