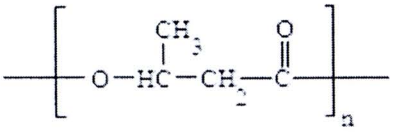
บทที่ 2

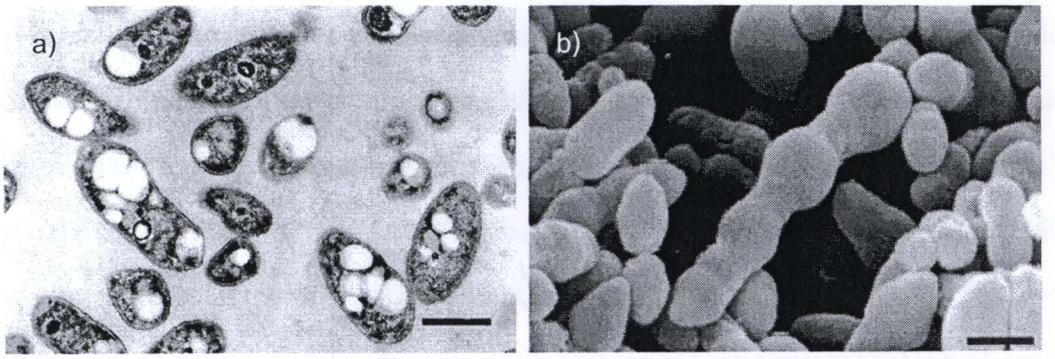
ตรวจเอกสาร

PHB ถูกค้นพบโดย Maurice Lemoigne เป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1925 ณ สถาบันปาสเตอร์ กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส โดย PHB ถูกแยกออกจาก *Bacillus Megaterium* โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (Luengo *et al.*, 2003) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ PHB

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตสายพอลิเมอร์ของกรดไขมันที่มีชื่อว่า บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ซึ่งเป็นการสะสมสารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ การสะสมพอลิเมอร์ชนิดนี้สามารถเกิดได้ในแบคทีเรียหลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Alcaligenes sp., Pseudomonas sp., Bacillus sp., Rhodospirillum sp., Halobacterium sp., Rhizobium sp. เป็นต้น* (Anderson และ Dawes, 1990) PHB มีลักษณะเป็นก้อนกลมๆ คล้ายไขมัน ลอยอยู่ในไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (ดังรูป 2a) โดย PHB นี้จะถูกสะสมอยู่ภายในแกรนูล (granule) (Amor *et al.*, 1991) หากเซลล์มีการสะสม PHB ในปริมาณมาก จะทำให้รูปร่างมีการเปลี่ยนแปลงไป (ดังรูปที่ 2) (Luengo *et al.*, 2003) หลังจากเซลล์ตายและมีการแตกเซลล์ พอลิเมอร์จะถูกปล่อยออกมา (Doi, 1995) ซึ่ง PHB จะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานให้กับเซลล์ได้



รูปที่ 2 a) ลักษณะของ PHB ที่สะสมอยู่ภายในแกรนูลของเซลล์ *Pseudomonas putida* ส่องโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (TEM) และ b) ลักษณะของเซลล์ที่มีรูปร่างเปลี่ยนไป เมื่อมีการสะสม PHB ในปริมาณมาก (SEM) (Luengo *et al.*, 2003)

โดยทั่วไปแล้วพบว่ากระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHB จะเกิดขึ้นในอัตราสูงเมื่อเซลล์จุลินทรีย์ผ่านเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตสูงสุดแล้ว และภายใต้ภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีปัจจัยบางชนิดจำกัด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ เป็นต้น (Anderson and Dawes, 1990; Poirier *et al.*, 1995) โดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ฟรุกโตส หรือ กากน้ำตาล เป็นต้น ให้เป็น อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) ซึ่งถ้าจุลินทรีย์อยู่ในภาวะที่มีสารอาหารต่างๆ สมดุลกัน อะซิติลโคเอจะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานและชีวมวล แต่ถ้าอยู่ในภาวะสารอาหารไม่สมดุลและมีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ อะซิติลโคเอจะถูกเปลี่ยนเป็น PHB ซึ่งการสังเคราะห์ PHB นั้น ต้องอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์เบต้า-คีโตไทโอเลส (β-ketothiolase) ทำหน้าที่เปลี่ยน อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) 2 โมเลกุล ให้กลายเป็น อะเซโตอะซิติลโคเอ (acetoacetyl-CoA) จากนั้น เอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-CoA reductase) จะเปลี่ยน อะซิโตอะซิติลโคเอไปเป็นไฮดรอกซีลโคเอ (hydroxyacetyl-CoA) โดยมี NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) และขั้นตอนสุดท้าย เอนไซม์ซินเทส (synthase) เร่งปฏิกิริยาการเกิดพันธะเอสเตอร์ระหว่างหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy group) ของไฮดรอกซีลโคเอโมเลกุลหนึ่ง กับปลายด้านคาร์บอกซิลของไฮดรอกซีลโคเออีกโมเลกุลหนึ่ง ทำให้สายพอลิเมอร์ยาวขึ้นเรื่อยๆ (Aldor, 2003)

ลักษณะโดยทั่วไปของ PHB คือ เป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของกรดไฮดรอกซีบิวทิริค (3-beta-hydroxybutyric acid) มีจุดหลอมเหลว 175 องศาเซลเซียส เป็นเทอร์โมพลาสติก

(thermoplastic) ที่มีลักษณะคล้ายเรซิน กล่าวคือ มีความหนืดสูงและสามารถหล่อให้เป็นรูปร่างต่างๆ ได้ตามต้องการที่อุณหภูมิใกล้เคียงหรือสูงกว่าจุดหลอมเหลวเล็กน้อย สำหรับคุณสมบัติที่สำคัญต่อสภาวะแวดล้อม คือ เป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) โดยจุลินทรีย์ทั้งแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน (Hankermeyer and Jieerde, 1998; Sudesh *et al.*, 2000) และสามารถนำมาผลิตสารจำพวกพลาสติก ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานต่างๆ ได้ (Azehar *et al.*, 2003; Fusun and Zeynep, 2000) PHB มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิโพรไพลีน (PP), พอลิเอทธิลีน (PE), และพอลิไวนีลคลอไรด์ (Ojumu *et al.*, 2004; Chen and Wu, 2005) ด้วยคุณสมบัติดังที่กล่าวมาทำให้มีการนำ PHB มาใช้ในการแก้ปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน (Patnaik, 2006) แม้ PHB จะมีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ในหลายๆ ด้าน แต่มีข้อเสีย คือ มีความเสถียรของการหลอมเหลวต่ำ เนื่องจากเกิดการสลายตัว (decompose) ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลว และ PHB จะเปราะเมื่อเวลาผ่านไปเพียงไม่กี่วันภายใต้สภาวะปกติ แต่สามารถลดความเปราะบางของ PHB ได้โดยการทำเป็นโคพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ตัวอื่น เช่น 3-ไฮดรอกซีวาริเลต หรือการผสม (blend) กับพอลิเมอร์ตัวอื่น หรือใช้วิธีสังเคราะห์ทางเคมี

การพัฒนากระบวนการผลิต PHB ให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นมีความสำคัญมาก เนื่องจากปัญหาของการผลิต PHB คือ การมีต้นทุนสูง ทำให้ปัจจุบันยังไม่สามารถผลิต PHB ออกมาใช้ได้อย่างแพร่หลาย การใช้สารตั้งต้นที่เป็นแหล่งวัตถุดิบทดแทนถูกนำมาใช้ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว เช่น วัตถุดิบทดแทน (sucrose, starch, cellulose), แหล่งฟอสซิล (มีเทน, ลิกไนต์, ถ่านหิน), byproduct (กากน้ำตาล, เวย์, กลีเซอรอล), สารเคมี (กรดไฮดรอกซีบิวทีริค) และคาร์บอนไดออกไซด์ (Reddy *et al.*, 2003)

จากงานวิจัยของ Weiner (1997) และ Lee และคณะ (2001) พบว่า แบคทีเรียบางชนิดในทะเลมีความสามารถในการผลิตสาร biopolymer จำพวก polyhydroxyalkanoates ซึ่งพื้นที่บริเวณแถบชายฝั่งมีเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio sp.* ที่สามารถผลิต PHB ได้ (Chien *et al.*, 2007; Arun *et al.*, 2009) และสายพันธุ์หนึ่งที่สำคัญ คือ *Vibrio natriegens* ที่สามารถผลิต PHB ได้ 41% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีลักษณะเด่นอีกอย่างหนึ่ง คือ มีระยะเวลาในการแบ่งตัวสั้น (9.8 นาที) (Chien *et al.*, 2007) จากคุณสมบัติดังกล่าว สามารถนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาใช้ในการผลิต PHB ระดับอุตสาหกรรมให้ได้ปริมาณมาก (Eagon, 1962; Farmer and Hickman-Brenner, 1992) อีกทั้งยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของการผลิต PHB (Choi and Lee, 1999; Chen *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2003) ได้อีกด้วย ในปัจจุบันการศึกษา

ทางด้านการผลิตพลาสติกชีวภาพในกลุ่ม PHAs โดยเชื้อจุลินทรีย์ในทะเลยังมีอยู่น้อยมาก (Sun *et al.*, 1994; Weiner, 1997) แต่จากความหลากหลายทางชีวภาพที่เกิดขึ้นทำให้การผลิต PHB โดยจุลินทรีย์ทางทะเลมีความน่าสนใจเพิ่มมากขึ้นซึ่งจัดเป็นแหล่งจุลินทรีย์แหล่งใหม่ที่สามารถผลิต PHB ได้ (Chien *et al.*, 2007) ทางผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการวิจัยนี้ เพื่อพัฒนากระบวนการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์จากทะเลสายพันธุ์ที่ได้รับคัดเลือกแล้ว (จากโครงการวิจัยเรื่องการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สะสมพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรตจากทะเล มหาวิทยาลัยศิลปากร) ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นและนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม จนสามารถนำพลาสติกชนิดใหม่นี้ไปใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ได้ต่อไปในอนาคต