1. บทนำ

1.1 ความสำคัญ ที่มา และปัญหา

ในปัจจุบันภาคอุสาหกรรมให้ความสนใจพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายง่าย และมีคุณสมบัติทนความร้อน โดยเฉพาะพอลิเมอร์ชีวภาพในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรท (polyhydroxybutyrate, PHB) ผลิตด้วยกรรมวิธีการหมักจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสที่มีผลต่อคุณลักษณะของ PHB ซึ่งสะสมอยู่ภายในเซลล์ (Steinbüchel et al., 1992) ตามด้วยการมองหาแหล่งวัตถุดิบที่สามารถลดต้นทุนการผลิต สามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีปริมาณมากและราคาถูก อย่างเช่น กากน้ำตาลจากหัวบีท (Page, 1992 a, b) เอทานอล (Alderet et al., 1993) เพื่อหาความเป็นไปได้ในการผลิตสาร PHB มาทดแทน Polypropylene ซึ่งเป็นพลาสติกทนความร้อน (thermoplastic) ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (Ramsay et al., 1990) แต่พอลิเมอร์ชนิดนี้สังเคราะห์จากปิโตรเลี่ยมย่อยสลายในธรรมชาติได้ยาก และยังขาดประสิทธิภาพเมื่อนำไปใช้ทางการแพทย์ ส่วนสาร PHB นี้มีคุณสมบัติและความสามารถดังกล่าวที่ Polypropylene ไม่มี รวมถึงสมบัติการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) และในแง่ของระบบนิเวศวิทยายังสามารถลดมลภาวะในธรรมชาติได้อีกด้วย เนื่องจากสาร PHB สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ โดยการทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ เพื่อหาอัตราการเจริญและการผลิตสาร PHB ในอาหารที่มีกากน้ำตาลอ้อยและน้ำแช่ข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ซึ่งคุณสมบัติของ PHB ที่ผลิตได้อาจจะมีผลกระทบมาจากสภาวะการเพาะเลี้ยง อาทิเช่น อาหารเลี้ยงที่มีปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันไป หรือกรรมวิธีการสกัดสาร PHB ออกจากเซลล์

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ได้ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถใช้กากน้ำตาล และน้ำแช่ข้าวโพดในการเจริญเติบโตและการผลิต PHB เชิงพานิชย์
2. เพื่อให้ได้สภาวะเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHB ให้มีคุณสมบัติทนความร้อน มีคุณสมบัติเชิงกล และน้ำหนักโมเลกุลเหมาะสมต่อการใช้งาน
3. เพื่อให้ได้กรรมวิธีการสกัด PHB ที่มีทั้งคุณภาพและปริมาณ

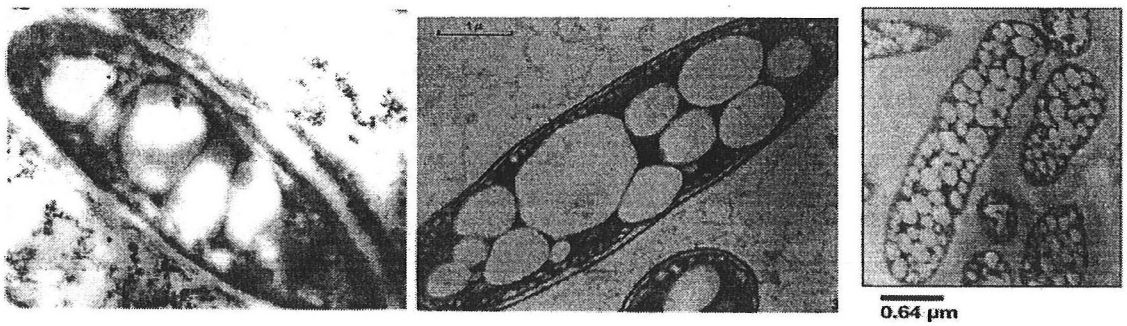
1.3 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 Polyhydroxybutyric acid (PHB)

คุณสมบัติเชิงกลหรือการทนต่อความร้อน และน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ชีวภาพ มีผลต่อประสิทธิภาพการนำพอลิเมอร์ไปใช้ในการขึ้นรูป Anderson และคณะ (1990) ให้ข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียต่างชนิดกัน จะให้น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ต่างกันด้วย ส่วน Chen และ Page (1994) รายงานว่า ความเข้มข้นของกากน้ำตาลจากหัวบีท ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ

เพาะเลี้ยง *Azotobacter vinelandii* สายพันธุ์ UWD มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ยิ่งมีความเข้มข้นของสับสเตรทสูงจะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ PHB ลดลง ฉะนั้นมีความเป็นไปได้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญ และผลิต PHB ให้มีคุณสมบัติทนความร้อน คุณสมบัติเชิงกล และมีน้ำหนักโมเลกุลเหมาะสมต่อการขึ้นรูปของสาร เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกากน้ำตาลอ้อย และน้ำแช่ข้าวโพด ซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรทดแทนราคาถูก และมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ผลิตเชิงพานิชย์

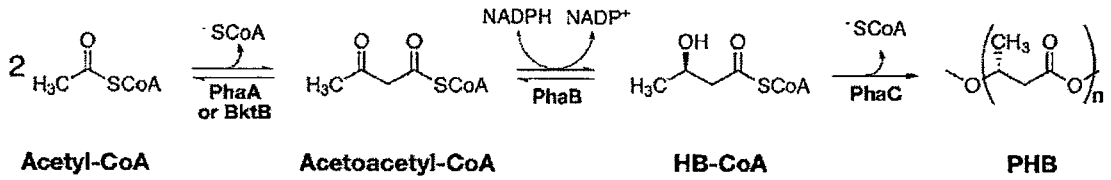
Polyhydroxybutyrate (PHB) คือพอลิเมอร์ของสารอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นพลาสติกทนความร้อน ย่อยสลายง่ายในธรรมชาติ และความเหมาะสมมีเสถียรภาพเมื่อนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิต PHB จะถูกสร้างและสะสมอยู่ภายเซลล์ของจุลินทรีย์ (รูปที่ 1.1) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำรองสำหรับการเจริญเติบโต โดยจุลินทีย์จะมีการสร้างสารพอลิเมอร์ชีวภาพนี้ มื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต เช่น มีแหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสเฟต หรือออกซิเจนที่จำกัด (Mona et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า PHB จะถูกสร้างเมื่อการเจริญเติบโตสูงสุด หรือเข้าสู่ระยะคงที่แล้ว (late exponential phase หรือ stationary phase) PHB เป็นสารมหโมเลกุล เมื่อถูกสลายให้สารโมเลกุลเล็ก (monomer) จะปล่อยพลังงานออกมาในรูปของ NADH เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน ในการสังเคราะห์โมเลกุลชีวภาพที่มีขนาดใหญ่ต่อไป



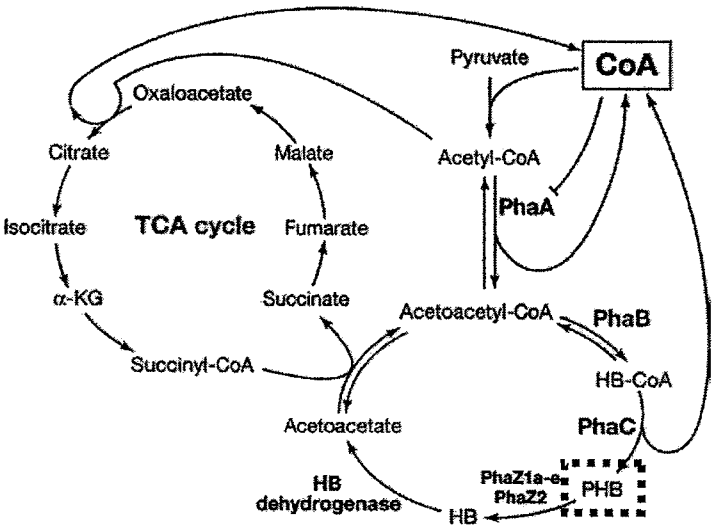
รูปที่ 1.1 การสะสมของ poly-hydroxybutyric acid ใน *Bacillus megaterium* (Mona et al., 2001) (ซ้าย) ใน *Alcaligenes* sp. (Sei Kwang Hahn et al., 1994) (กลาง) และ *Wautersia eutropha* (Stubbe et al., 2005) (ขวา)

PHB ที่พบภายในเซลล์จุลินทรีย์มี 2 ลักษณะคือ PHB ที่ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มฟอสฟอลิปิดชั้นเดียวในลักษณะของเม็ดแข็ง (granule) และแบบไม่มีเยื่อหุ้ม ซึ่งแบบที่มีเยื่อหุ้มนี้จะบรรจุ PHB ประมาณร้อยละ 93.8-94.9 ของมวลเซลล์ อีกร้อยละ 5.1-6.2 ของมวลแห้งโดยทั่วไปจะเป็นส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ส่วน PHB ที่ไม่มีเยื่อหุ้มจะอยู่ในลักษณะของสารกึ่งเหลวที่ลอยอยู่ในไซโตพลาสม (inclusion body) ปัจจุบันพบว่า PHB ที่สกัดได้จากเซลล์จะอยู่ในรูปของสารกึ่งเหลว และเม็ดแข็ง จำนวน PHB แกรนูลภายในเซลล์จะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ สภาวะการเจริญเติบโต และแหล่งอาหารที่จุลินทรีย์ใช้ PHB ถูกสังเคราะห์มาจากสารตั้งต้น acetyl-CoA โดยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ ß-

ketothiolase, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase และPHB synthase เอนไซม์เหล่านี้จะถูกผลิตมาจากรหัสของจีน phbA, phbB และphbC ตามลำดับ (รูปที่ 1.2) (Rehm, 2003)



รูปที่ 1.2 วิถีชีวสังเคราะห์ของ Poly-hydroxybutyric acid (Rehm, 2003)

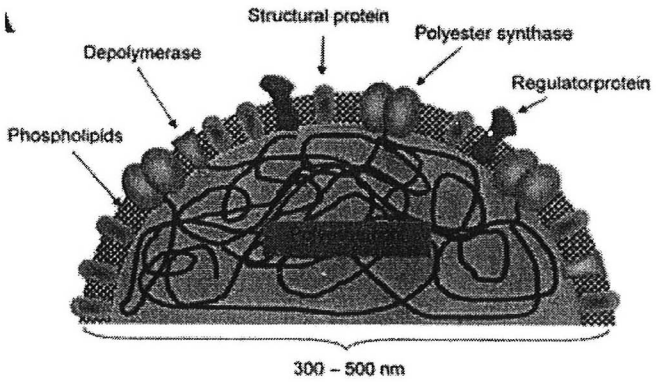


รูปที่ 1.3 ความสัมพันธ์ของวิถีชีวสังเคราะห์ของ Polyhydroxybutyric acid กับวิถีชีวสังเคราะห์อื่น (Rehm, 2003)

อย่างไรก็ตามวิถีชีวสังเคราะห์ของ poly-hydroxybutyric acid ยังมีความสัมพันธ์กับวิถีชีวสังเคราะห์อื่นๆ เช่น TCA cycle, glycolysis เป็นต้น วิถีชีวสังเคราะห์ PHB จะถูกควบคุมจากสภาวะแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณออกซิเจนที่จำกัดของเชื้อ *Azotobacter beijerinckii* ซึ่งเป็นพวก aerobic bacteria โดยเมื่ออัตราส่วนของ NADH ต่อ NAD (NADH/NAD ratio) เพิ่มขึ้น จะทำให้ NADH ไปยับยั้ง Citrate synthase และ Isocitrate dehydrogenase ใน TCA cycle เป็นเหตุให้มี acetyl-CoA เข้าสู่วัฏจักร TCA cycle ลดลง ทำให้ acetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น acetoacetyl-CoA โดย β-ketothiolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีชีวสังเคราะห์ของ PHB แต่เมื่อปริมาณของออกซิเจนสูงขึ้น β-ketothiolase จะ

ถูกยับยั้ง ทำให้วิถีชีวสังเคราะห์ของ PHB หยุดลง ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าในสภาวะแวดล้อมที่มีออกซิเจนจำกัดจะมีการนำคาร์บอนเข้าสู่ TCA cycle ลดลง และ PHB ก็จะถูกสังเคราะห์และสะสมอยู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำรอง (รูปที่ 1.3) (Anderson et al., 1990)

ส่วนกลไลการสร้าง PHB แกรนูลใช้หลักกลไกการเร่งปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ Fatty acid synthase (β-ketoacyl acyl-carrier protein synthase) ใน Fatty acid metabolism ส่วนในการสร้าง PHB แกรนูลจะมีเอนไซม์ 2 ตัวคือ α –hydrolase และβ –hydrolase ที่มีหมู่ Thiol ทำหน้าที่เป็น covalent catalysis โดยหมู่แรก จะเป็นบริเวณที่บรรจุ 3-hydroxybutyric-CoA และหมู่ที่ 2 จะเป็นบริเวณเริ่มการสังเคราะห์และขยายความยาวของสายพอลิเมอร์ PHB (polymerization) ด้วย PHB/PHA synthase ทำให้สารพอลิเมอร์ไม่ละลายน้ำเมื่อสายยาวมากขึ้น และจะมีการรวมกันเป็นแกนของ PHB (PHB/PHA core) อยู่บริเวณตรงกลางของแกรนูล นอกจากนี้ยังพบว่า PHB/PHA synthase ที่ผิวของ PHA/PHB core จะนำไปสู่การสร้างในรูปของ PHA/PHB แกรนูล อีกด้วย (Rehm, 2003) (รูปที่ 1.4)

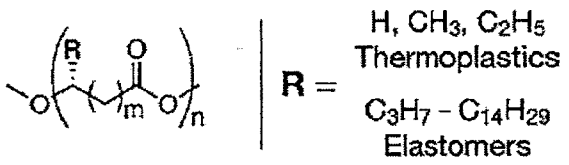


รูปที่ 1.4 แสดงลักษณะของ PHB แกรนูล (Rehm, 2003)

โครงสร้างทางเคมีของ PHAs หรือ PHB มีลักษณะสายยาวของ hydroxy fatty acids โดยมี side chain เป็นหมู่ alkyl(R) ซึ่งมีผลทำให้พอลิเมอร์มีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ถ้าหมู่ R ในสายยาวของ hydroxy fatty acids เป็น H, CH_3 หรือ C_2H_5 พอลิเมอร์จะมีคุณสมบัติที่ทนความร้อน (thermoplastics) ถ้าหมู่ R เป็น C_3H_7 – $C_{14}H_{29}$ พอลิเมอร์ที่ยืดหยุ่น (elastomers) โดยทั้งหมดนี้สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (รูปที่ 1.5)

ลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของ PHB เป็น right-handed helix เกลียว เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.596 nm และมีไครอล (chiral center) เป็นหน่วยเล็กซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นหมู่ R PHB นี้มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ Polypropylene ที่ผลิตจากปิโตรเลียม มีลักษณะโครงสร้างเป็นเกลียว และสมบัติทางกายภาพทนความร้อนสูงได้เช่นกัน แต่ polypropylene ไม่มีสมบัติทางชีวภาพ เช่น การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradability) และความเหมาะสมอย่างมีเสถียรภาพในการใช้งานกับสิ่งมีชีวิต

(Biocompatibility) นอกจากนี้ PHB และ Polypropylene ยังมีสมบัติทางกายภาพที่ใกล้เคียงกันคือ การสร้างผลึก (Crystallinity) อุณหภูมิที่ใช้เปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็งเช่น การทำพลาสติก (Glass Transition Temperature;Tg) และกำลังต้านทานการดึง (Tensile strength, MPa) ส่วนสมบัติทางเคมีของ PHB ที่สำคัญคือ ทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลต (UV resistance) แต่ไม่สามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้ (ตารางที่ 1.1)



รูปที่ 1.5 แสดงโครงสร้างของ PHAs ที่มีสมบัติตามการจับของหมู่ alkyl (R) (Stubbe *et* al., 2005)

ตารางที่ 1.1 แสดงสมบัติทางกายภาพ และเคมีของ Polypropylene และ PHB

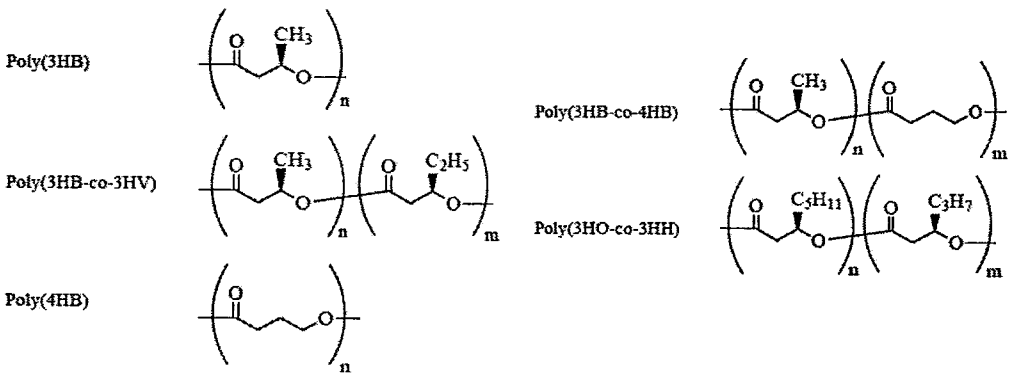
Parameter	Polypropylene(PP)	PHB
Melting point Tm (°C)	171 - 186	171 - 182
Glass Transition Temperature (Tg) (°C)	-15	5 -10
Crystallinity (%)	65 - 70	65 - 80
Density (g cm^{-3})	0.905 - 0.94	1.23 - 125
Molecular weight distribution (x10^{-5})	2.2 - 7	1 - 8
Molecular weight distribution	5 - 12	2.2 - 3
Flexural modulus (GPa)	1.7	3.5-4
Tensile strength (MPa)	39	40
Extension to break (%)	400	6 - 8
UV resistance	Poor	Good
Solvent resistance	Good	Poor
Oxygen permeability ($cm^3m^{-2}atm^{-1}d^{-1}$)	1700	45
Biodegradability	-	Good
other	Due to low density floats in aquatic system	Due to more density goes to the sediment in aquatic system

1.3.2 การนำ PHB ไปใช้ประโยชน์

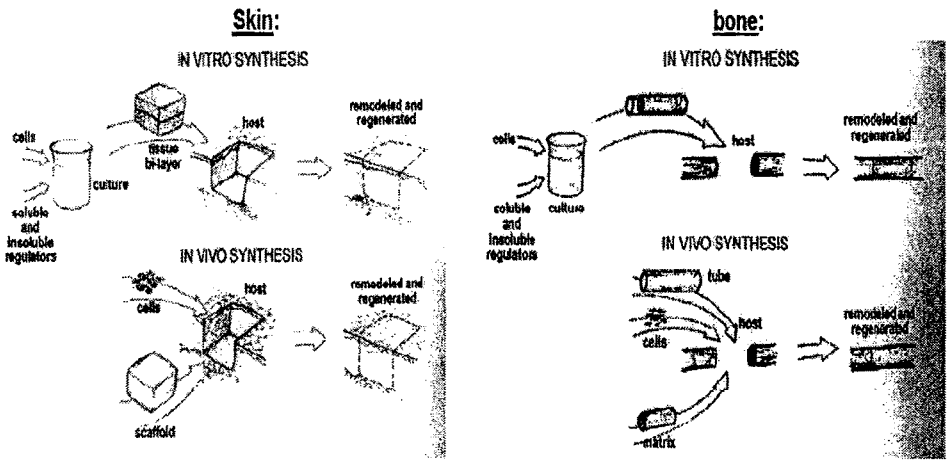
ปัจจุบันการที่ PHB มีสมบัติทางชีวภาพแตกต่างไปจาก Polypropylene สมบัติทางกายภาพที่คล้ายกันมาก จึงทำให้ PHB มีความสามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบทางเคมี โดยเฉพาะจากแหล่งปิโตเลียมที่ใกล้จะหมดในอนาคต (Anderson et al., 1990) PHB สามารถนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมอาหาร ทางการแพทย์ ทางทันตกรรม และทางเภสัชกรรม โดยเฉพาะในทางการแพทย์ PHB สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากการมีคุณสมบัติ Biocompatibility ของ PHB โดยสามารถนำไปซ่อมแซมหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular repair) ซ่อมแซมฟัน (Dental repair) ซ่อมแซมเส้นประสาท (Nerve repair) การเปลี่ยนกระดูก (Bone replacement) Orthopedic และการจัดการบาดแผล (Wound management) (รูปที่ 1.7 และ 1.8) โดยทั่วไปแล้วสารในกลุ่ม PHB ก็สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเช่นกัน รวมถึงมนุษย์ด้วย คือ D(-)-3-hydroxybutyric acid ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางในเมตาบอลิซึม มีมวลโมเลกุลต่ำ มี 100-200 โมเลกุลเล็ก

อย่างไรก็ตาม PHB ที่มาจากการสร้างของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ พบว่ามีสารพิษ (Endotoxin) PHB ด้วย ซึ่งมาจากส่วนของ lipopolysaccharides ผลเมื่อได้รับเข้าไปจะมีไข้สูง ดังนั้น U.S. Food and Drug Administration guideline จึงได้กำหนดปริมาณสารพิษ ไม่ควรสูงกว่า 0.5 unit endotoxin/kg ของน้ำหนักตัว (Lee et al., 1995) ส่วนกระบวนการที่นำสารพิษออกนั้นมี 2 วิธี คือ 1.ใช้สารพวกเปอร์ออกไซด์ 2.ใช้สารพวกโซเดียมไฮดรอกไซด์

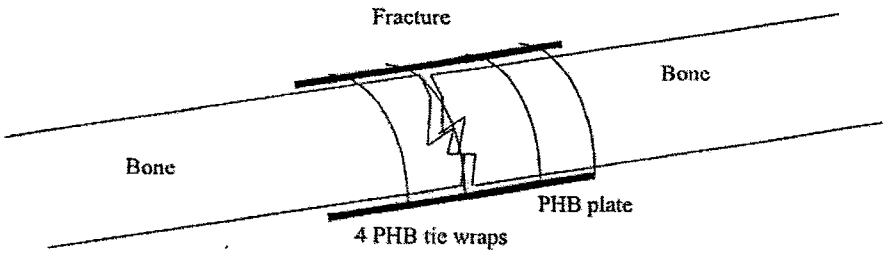
ในปัจจุบันบริษัท American company, Tepha, Inc. ได้มีการพัฒนาเกี่ยวกับวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยใช้สาร PHAs และPHB โดยการวิจัยพบว่ามี PHAs 5 ชนิด ที่สามารถใช้ในสิ่งมีชีวิตได้คือ Poly-3-hydroxybutyric acid(PHB), Poly(3H-co-3HV), Poly(4HB), Poly(3HB-co-4HB) และPoly(3HO-co-3HH) (รูปที่ 1.6) (Williams and Martin, 1996)



รูปที่ 1.6 แสดงชนิดของ PHAs ที่ใช้ในทางการแพทย์ (Williams and Martin, 1996)

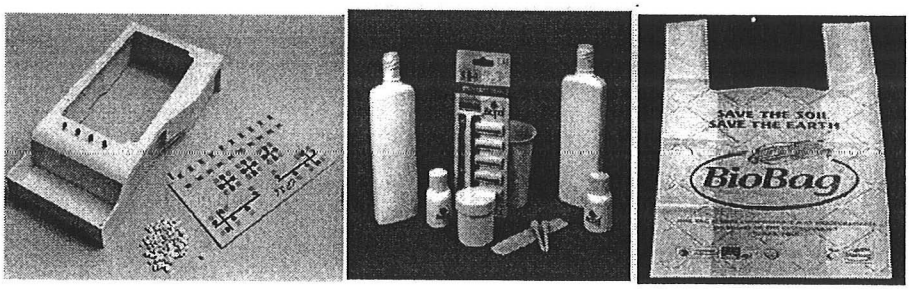


รูปที่ 1.7 แสดงลักษณะการนำ Biodegradable polymer มาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) (Griffith et al., 2002)



รูปที่ 1.8 แสดงลักษณะการนำ PHB มาใช้ในศัลยกรรม (Orthopedic) (Koets et al., 2003)

เนื่องจากการใช้พลาสติกที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งเป็นวัสดุที่ย่อยสลายยาก และเป็นปัญหาสำคัญของโลกในปัจจุบัน จึงมีความพยายามแก้ปัญหาโดยการแสวงหาและพัฒนาวัสดุที่มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate) หรือ PHB ซึ่งเป็นพอลิเอสเทอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี เช่น พอลิโพรไพลีน จึงสามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายประเภท เช่น กลุ่มบรรจุภัณฑ์ เครื่องใช้ในครัวเรือน เครื่องใช้ไฟฟ้า (รูปที่ 1.9)



รูปที่ 1.9 การนำ PHB ไปใช้ประโยชน์ในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ต่างๆ

1.3.3 การทดสอบความสามารถของพลาสติกชีวภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพและความเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม

การถือกำเนิดขึ้นมาของพลาสติกเมื่อศตวรรษที่แล้ว ก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงขนานใหญ่ในอุตสาหกรรม เพราะพลาสติกเป็นวัสดุขึ้นรูปง่าย มีความหนาแน่นน้อย แข็งแรง ทนทาน สามารถปรับแต่งสมบัติได้ตามความต้องการ และมีราคาไม่แพง หลายอุตสาหกรรมจึงนำพลาสติกมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง ตั้งแต่ผลิตบรรจุภัณฑ์ส่วนประกอบและโครงสร้างอุปกรณ์ต่างๆ

ด้วยเหตุที่พลาสติกหลายชนิดมีราคาค่อนข้างถูก จึงนิยมนำมาผลิตบรรจุภัณฑ์ประเภทใช้แล้วทิ้ง เช่น ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฯลฯ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาขยะ และสิ่งแวดล้อมตามมาในภายหลัง เพราะพลาสติกส่วนใหญ่ไม่ย่อยสลาย หรือย่อยสลายตามธรรมชาติยากมาก บางชนิดใช้เวลาย่อยสลายนับร้อยปี จึงมีความพยายามในการวิจัยและพัฒนาพลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) เพื่อแก้ปัญหา ซึ่งพลาสติกประเภทนี้หลายครั้งถูกเรียกว่า ไบโอพลาสติก (Bioplastic) งานวิจัยพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของเอ็มเทคในประเทศไทย พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพยังต้องนำเข้าทั้งในรูปผลิตภัณฑ์สำเร็จ และ/หรือเม็ดพลาสติกที่ผสมเสร็จแล้ว เมื่อผนวกกับค่าขนส่งทำให้ผลิตภัณฑ์สำเร็จและเม็ดพลาสติกมีราคาสูง จนกลายเป็นข้อจำกัดหนึ่งในการนำพลาสติกย่อยสลายได้มาใช้งานในประเทศ ดร.ธนาวดี ลี้จากภัย และทีมวิจัยด้านพลาสติกชีวภาพห้องปฏิบัติการเคมีโพลิเมอร์ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ จึงทำการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตเม็ดพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยเลือกแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลักแทนข้าวโพด เพราะเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีปริมาณมาก หาได้ง่าย และราคาถูก (ในต่างประเทศนิยมใช้แป้งข้าวโพดผสมลงในเม็ดพลาสติกย่อยสลายได้) ทั้งนี้งานวิจัยมีเป้าหมายในการพัฒนาเม็ดไบโอพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพราคาถูก และสามารถแข่งขันได้ออกมาเม็ดไบโอพลาสติกที่พัฒนาขึ้นมีจุดเด่นหลายอย่าง ดังนี้

1. มีแป้งมันสำปะหลังและ/หรือวัสดุจากธรรมชาติเป็นองค์ประกอบหลักอย่างน้อย 50%
2. สามารถปรับสัดส่วนแป้งได้ง่ายด้วยเทคโนโลยีการคอมพาวด์ (compound) ที่ทีมวิจัยฯ พัฒนาขึ้นเอง

3. ไม่ก่อให้เกิดปัญหาขณะขึ้นรูป ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมามีเนื้อเนียนเรียบ และมีสมบัติเชิงกลดี

4. สามารถขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกต่างๆ ได้ด้วยเครื่องจักรขึ้นรูปพลาสติกทั่วไป ไม่ต้องดัดแปลงเครื่องมือ

การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ

เดิมการทดสอบการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพมักทำในสภาพแวดล้อมปกติ เช่น ทำการทดสอบที่ผิวดินโดยการปูทับหน้าดิน หรือฝังดินในช่วงเวลาต่างๆ แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่หายไป ซึ่งผลการทดสอบไม่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล เนื่องจากการทดสอบวิธีนี้ไม่สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลกระทบ ไม่สามารถทราบอัตราการย่อยสลายในช่วงเวลาต่างๆ ชิ้นงานอาจสูญหายระหว่างการทดสอบ และเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบพอลิเมอร์หรือพลาสติกที่สามารถดูดซับน้ำได้ เพราะทำให้ได้ข้อมูลน้ำหนักผิดพลาดไม่ตรงความจริง นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างทางสภาวะแวดล้อมของที่ตั้งภูมิประเทศ ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองที่เหมือนเดิมได้ทุกครั้ง

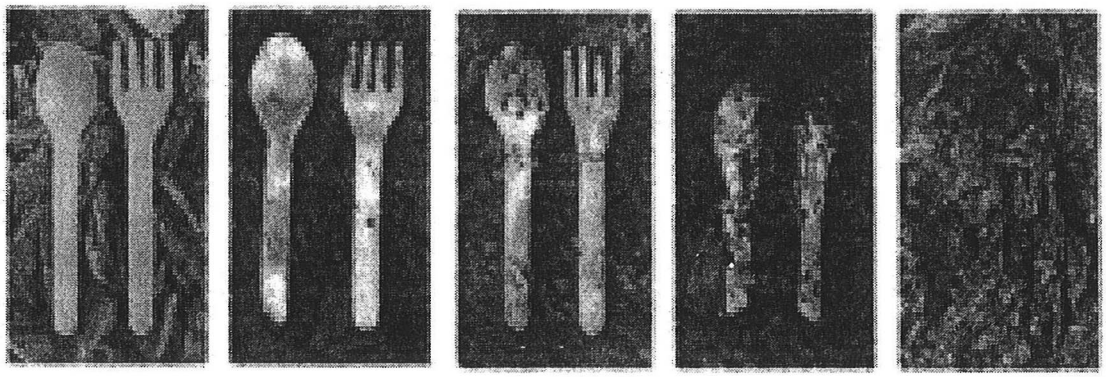
ทั้งนี้มาตรฐานสากลที่ได้รับการยอมรับระดับนานาชาติ เช่น ISO ASTM และ JIS กำหนดให้ผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพต้องผ่านการทดสอบ 4 ข้อจึงจะได้รับการยืนยันและรับรองว่ามีสมบัติตามที่มาตรฐานกำหนด ซึ่งการทดสอบ 4 ข้อมีดังนี้

1. การประเมินการย่อยสลายได้เบื้องต้นจากการศึกษาโครงสร้างทางเคมี
2. อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability)
3. อัตราการแตกละเอียดระหว่างกระบวนการหมักทางชีวภาพ (disintegration during biological treatment)
4. การวิเคราะห์คุณภาพ และความเป็นพิษต่อระบบนิเวศน์ (ecotoxicity) ทีมวิจัยฯ ได้ตั้งห้องปฏิบัติการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของพลาสติกตามมาตรฐานสากล ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการแห่งแรก และแห่งเดียวในประเทศที่สามารถทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของพลาสติกในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ตามมาตรฐาน ASTM D 5338-03 และ ISO 14855-04 และดัดแปลงสำหรับการทดสอบตามมาตรฐาน ISO 14851-04 และ ISO 14852-04 ซึ่งเป็นมาตรฐานสากลที่ได้รับการยอมรับ

ผลทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ

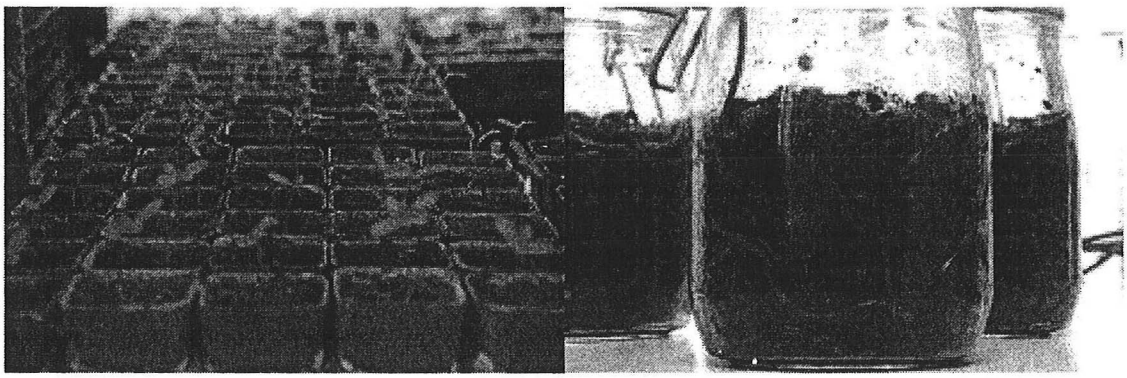
ทีมวิจัยฯ ได้ทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของฟิล์ม ที่ผลิตจากเม็ดไบโอพลาสติกโดยอ้างอิงตามมาตรฐาน ISO 14855-99 พบว่าถุงพลาสติกที่นำมาทดสอบถูกย่อยสลายทางชีวภาพ 73.31% ภายใต้สภาวะการทดสอบ 120 วัน แต่เมื่อนำถุงพลาสติกมาทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ พร้อมขยะอินทรีย์ภายใต้สภาวะการหมักในโรงหมักขยะอินทรีย์ พบว่าถุงที่ใส่ขยะอินทรีย์ถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว โดยในระยะเวลา 3 เดือนถุงถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ จนไม่พบเศษถุงตกค้างในกองปุ๋ยหมัก นอกเหนือ

จากการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ ทีมวิจัยฯยังทดสอบเรื่องความเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม (ecooxicity test) โดยนำวัสดุที่ได้จากการหมักถุงไบโอพลาสติกรวมกับขยะอินทรีย์ไปเพาะกล้าต้นไม้ และเลี้ยงไส้เดือนดิน และปรากฏผลว่า วัสดุไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์



รูปที่ 1.10 การย่อยสลายของ PHB ภายใต้สภาวะการทดสอบ 120 วัน (MTEC, 2008)

นอกจากนี้ PHB ยังได้ผ่านการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของพลาสติกโดยอ้างอิงตามมาตรฐาน ISO 14855-99 พบว่า พลาสติกที่ผลิตจาก PHB ถูกย่อยสลายทางชีวภาพ 73.31% ภายใต้สภาวะการทดสอบ 120 วัน (รูปที่ 1.10) แต่เมื่อนำพลาสติกมาทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพพร้อมขยะอินทรีย์ภายใต้สภาวะการหมักในโรงหมักขยะอินทรีย์ พบว่า พลาสติกที่ผสมกับขยะอินทรีย์ถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว โดยในระยะเวลา 3 เดือนก็จะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จนไม่พบเศษพลาสติกตกค้างในกองปุ๋ยหมัก นอกเหนือจากการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ ยังทดสอบเรื่องความเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม (ecotoxicity test) โดยนำวัสดุที่ได้จากการหมักถุงไบโอพลาสติกรวมกับขยะอินทรีย์ไปเพาะกล้าต้นไม้ และเลี้ยงไส้เดือนดิน และปรากฏผลว่า วัสดุไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ (รูปที่ 1.11)



รูปที่ 1.11 การทดสอบความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (MTEC, 2008)

1.3.4 วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHB

กากน้ำตาล (Molasses)

กากน้ำตาล คือสิ่งที่ปล่อยทิ้งมาจากกระบวนการเตรียมน้ำตาลซูโครส โดยทำให้ระเหย ตกผลึก และการปั่นเหวี่ยงของน้ำจากน้ำตาลอ้อย และน้ำตาลหัวบีต กากน้ำตาลที่รู้จักมีน้ำตาลประมาณร้อยละ 43 ซึ่งโดยส่วนใหญ่กากน้ำตาลจะนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

ชนิดของกากน้ำตาล

1. กากน้ำตาลจากอ้อย (cane molasses) เป็นส่วนที่เหลือจากกระบวนการกลั่นของซูโครสจากอ้อย โดยมีอย่างน้อยร้อยละ 46 เป็นน้ำตาลอินเวิสต์
2. กากน้ำตาลจากหัวบีต (beet molasses) เป็นส่วนที่เหลือจากกระบวนการทำซูโครสจากหัวบีต โดยมีอย่างน้อยร้อยละ 48 เป็นน้ำตาลอินเวิสต์
3. กากน้ำตาลจากไซทรัส (citrus molasses) เป็นส่วนที่เหลือจากกระบวนการทำซูโครสจากอ้อย โดยมีน้ำตาลอย่างน้อย ร้อยละ 45
4. กากน้ำตาลจากการสกัดเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose extract) เป็นส่วนที่เหลือจากกระบวนการเตรียมไม้ ซึ่งวัสดุนี้จะถูกทำให้เข้มข้นโดยใช้อุณหภูมิ และความดัน นอกจากนี้ยังมีการใช้ กรด ด่าง หรือเกลือ ด้วย โดยสารที่ได้จะประกอบไปด้วย น้ำตาลเพนโตส และน้ำตาลเฮกโซส โดยรวมแล้วจะมีคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 55
5. กากน้ำตาลจากแป้ง (starch molasses) เป็นส่วนที่เหลือจากกระบวนการทำแป้งจากข้าวโพด หรือเมล็ดข้าวฟ่าง ซึ่งจะถูกไฮโดไลด์ด้วยกรดหรือเอมไซม์ โดยจะประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวส์อย่างน้อยร้อยละ 43 กล่าวคือจะมีน้ำตาลรวมประมาณอย่างน้อยร้อยละ 50 และร้อยละ 73 เป็นของแข็ง

กากน้ำตาลที่เหลือจากการผลิตต่างๆ จะมีประมาณแร่ธาตุที่แตกต่างกันตามชนิดของกากน้ำตาล (ตารางที่ 1.2, 1.3, 1.4) ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อส่วนประกอบของกากน้ำตาล ได้แก่ ชนิดของดินที่ใช้ในการปลูกพืชผลิตน้ำตาล อุณหภูมิล้อมรอบ ความชื้น ฤดูกาลในการผลิตน้ำตาล ขั้นตอนในการผลิต และการเก็บรักษาต่างๆ (Curtin,1983)

ตารางที่ 1.2 แสดงส่วนประกอบในกากน้ำตาลชนิดต่างๆ (Curtin,1983)

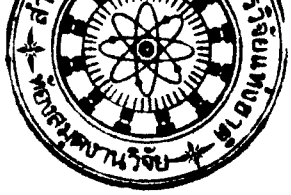
Item	Cane	Beet	Citrus	Extract	Starch
Brix	79.5	79.5	71.0	65.0	78.0
Total Solids (%)	75.0	77.0	65.0	65.0	73.0
Specific Gravity	1.41	0.41	1.36	1.32	1.40
Total Sugars (%)	46.0	48.0	45.0	55.0	50.0
Crude Protein (%)	3.0	6.0	4.0	0.5	0.4
Nitrogen Free Extract (%)	63.0	62.0	55.0	55.0	65.0
Total Fat (%)	0.0	0.0	0.2	0.5	0.0
Total Fiber (%)	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0
Ash (%)	8.1	8.7	6.0	5.0	6.0
Calcium, (%)	0.8	0.2	1.3	0.8	0.1
Phosphorus, (%)	0.08	0.03	0.15	0.05	0.2
Potassium, (%)	2.4	4.7	0.1	0.04	0.02
Sodium, (%)	0.2	1.0	0.3	---	2.5
Chlorine, (%)	1.4	0.9	0.07	---	3.0
Sulfur, (%)	0.5	0.5	0.17	---	0.05
Energy (kcal/kg)					
Swine (ME)	2343	2320	2264	2231	---
Poultry (ME_N)	1962	1962	---	---	---

ตารางที่ 1.3 แสดงแร่ธาตุในกากน้ำตาลชนิดต่างๆ (Curtin,1983)

Mineral	Cane	Beet	Citrus
Copper, mg/kg	36	13	30
Iron, mg/kg	249	117	400
Manganese, mg/kg	35	10	20
Zinc, mg/kg	13	40	---

ตารางที่ 1.4 แสดงวิตามินในกากน้ำตาลชนิดต่างๆ(Curtin.1983)

Vitamin	Cane	Beet	Citrus
Biotin, mg/kg	0.36	0.46	---
Choline, mg/kg	745.0	716.0	---
Pantothenic Acid, mg/kg	21.0	7.0	10.0
Riboflavin, mg/kg	1.8	1.4	11.0
Thiamine, mg/kg	0.9	---	---



น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor)

ในกระบวนการของการโม่แป้ง (wet milling) เพื่อผลิตแป้งข้าวโพด จะมีส่วนของ รำ โปรตีนกลูเต็น และน้ำแช่ข้าวโพดออกมาด้วย ซึ่งน้ำแช่ข้าวโพดจะประกอบด้วยมวลของข้าวโพดแห้งร้อยละ 6-8 และในบางประเทศได้มีการนำน้ำแช่ข้าวโพดมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อีกด้วย โดยในกระบวนการผลิตแป้งข้าวโพดจะมีการปล่อยของเสียออกมา ของเสียนั้นจะมีส่วนของสารละลายของข้าวโพด และส่วนของผลิตภัณฑ์จากการหมักในขั้นของการแช่ข้าวโพด ซึ่งจะมีปริมาณของวิตามิน กรดอะมิโน สารประกอบไนโตรเจน และแร่ธาตุอื่นในปริมาณที่มาก ดั้งนั้นน้ำแช่ข้าวโพดจึงมีความเหมาะสมในอุตสาหกรรมหลายอย่างๆ (Filipovic et al.2002)

กระบวนการผลิตแป้งข้าวโพดและน้ำแช่ข้าวโพด

ในอุตสาหกรรมโม่แป้งข้าวโพดมีมากว่า 150 ปี โดยในการสกัดของอุตสาหกรรมนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆมากกว่า 100 ผลิตภัณฑ์และของเสียต่างๆ เช่น น้ำเชื่อมข้าวโพด น้ำเชื่อมฟรุคโตสจากข้าวโพด แป้ง อาหารสัตว์ น้ำมัน และแอลกอฮอล์

เมล็ดข้าวโพดนั้นแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ 1. ผิวนอก (Outer skin) 2. ส่วนต้นอ่อน (Germ) ที่มีน้ำมันมาก 3. เอนโดสเปิร์ม (endosperm) จะมีส่วนของโปรตีน และแป้งมาก โดยข้าวโพดหนัก 25 กิโลกรัม จะสามารถผลิตแป้ง 14 กิโลกรัม อาหารสัตว์ 6.6 กิโลกรัม น้ำมัน 0.9 กิโลกรัม และส่วนที่เหลือจะเป็นน้ำ

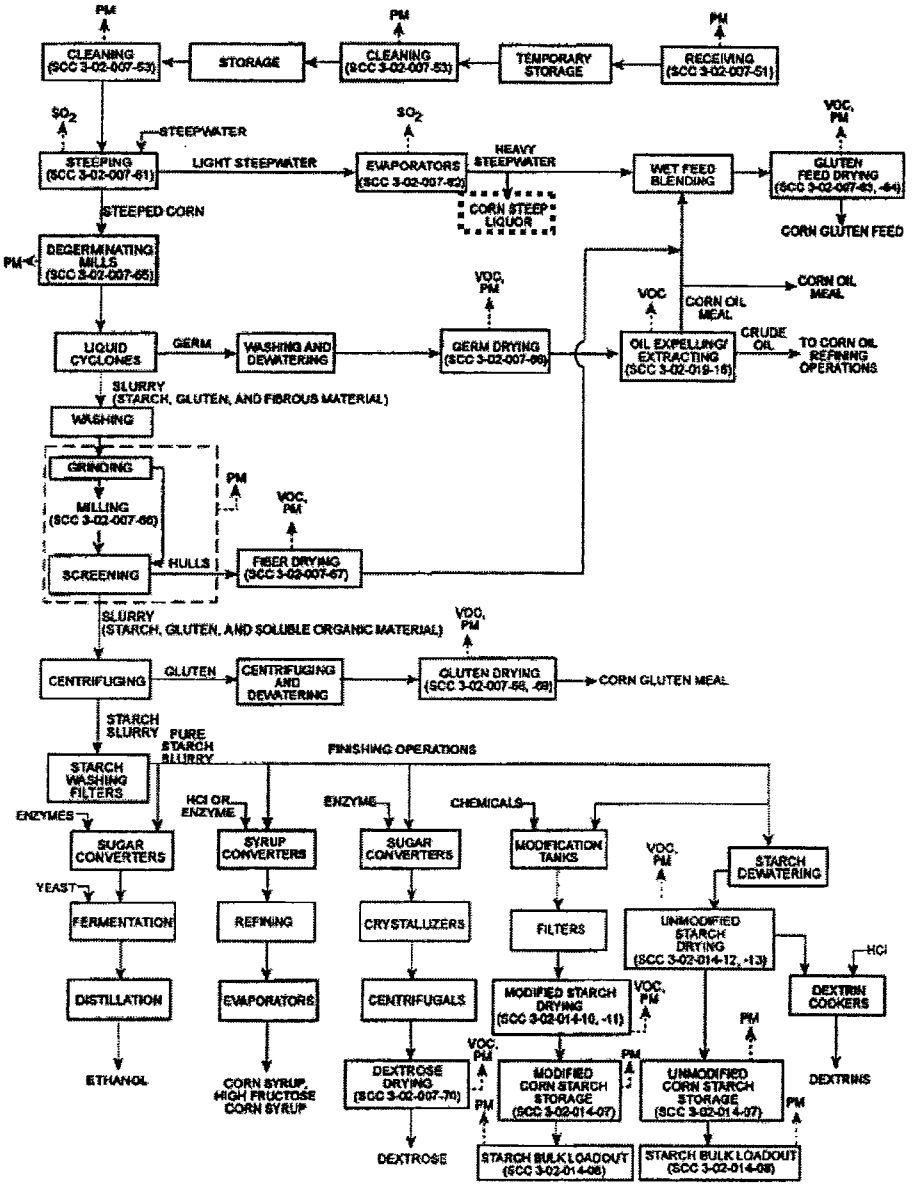
ในขั้นแรกข้าวโพดที่ได้มาจะมีนำเอาเปลือกออกก่อน จากนั้นนำไปล้าง 2 ครั้งเพื่อนำส่วนของเศษเปลือก เศษหิน หรือเศษของฝักออกให้หมด นำส่วนข้าวโพดที่ล้างย้ายไปที่ถังแช่ข้าวโพด (steep tank) โดยขั้นตอนในการแช่ข้าวโพด ในขั้นนี้จะทำให้เมล็ดข้าวโพดนิ่ม เพื่อเป็นการช่วยสลายโปรตีนบางส่วน ส่วนประกอบแป้งถูกแยกออกไป ถังแช่ข้าวโพดมีขนาดประมาณ 70.5 – 458 ลูกบาศก์เมตร ต่อกันเป็นทอดๆ ซึ่งการแช่ข้าวโพดนี้จะทำการเจือจางโดยใช้กรดซัลฟูริก ที่อุณหภูมิประมาณ 52 องศาเซลเซียส แช่เป็นเวลา 28–48 ชั่วโมง เมื่อครบชั่วโมงส่วนของน้ำแช่ข้าวโพดจะถูกส่งไปที่เครื่องระเหยน้ำออกเพื่อทำให้เข้มข้น (evaporator) และส่วนของข้าวโพดที่แช่จะถูกส่งไปที่เครื่องปั่นเหวี่ยง (liquid cyclones) เพื่อแยกได้เป็นน้ำเข้มข้น (Slurry) ที่ประกอบด้วย แป้ง โปรตีนกลูเต็น และเส้นใย

ส่วนของน้ำแช่ข้าวโพดถ้าระเหยเพียงครั้งเดียวเรียกว่า Light steep water ซึ่งจะมีโปรตีนประมาณร้อยละ 35 – 45 เมื่อระเหยหลายๆครั้ง น้ำแช่ข้าวโพดจะเข้มข้นขึ้นเรียกว่า Heavy steep water หรือ Corn steep liquor ซึ่งจะมีโปรตีนประมาณร้อยละ 30 – 50 น้ำแช่ข้าวโพดที่ระเหยแล้วส่วนใหญ่จะนำไปเลี้ยงสัตว์ แต่บางครั้งน้ำแช่ข้าวโพดก็นำไปใช้เป็นแร่ธาตุในกระบวนการหมัก

ในขั้นตอนที่แยกแป้ง โปรตีนกลูเต็น และเส้นใยออกมา จะเหลือส่วนของ germ ซึ่ง germ นี้จะถูกนำไปสกัดน้ำมัน เป็นน้ำมันข้าวโพด (Corn oil) และสกัดบางส่วนของโปรตีนกลูเต็น (partial gluten extraction) เพื่อเป็นอาหารสัตว์ น้ำเข้มข้น (Slurry) ที่ประกอบด้วย แป้ง โปรตีนกลูเต็น และเส้นใย ทั้ง 3 ถูกแยกโดยการปั่นเหวี่ยง โดยโปรตีนกลูเต็นจะถูกแยกออกไป เพื่อระเหยน้ำเป็นโปรตีนกลูเต็นจากข้าวโพด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 5 มิ.ย. 2551
ทะเบียน 241748
เรียกหนังสือ

(corn gluten meal) ส่วนน้ำแป้งเข้มข้น (Starch slurry) ที่เหลือจะนำเข้าสู่การผลิตแป้งข้าวโพด (Corn starch) น้ำตาลข้าวโพด (Corn sugar) เด็กตรินส์ (Dextrins) เด็กโตส (Dextose) น้ำเชื่อมข้าวโพด (Corn syrup) และแอลกอฮอล์ต่อไป ด้วยวิธีการที่แตกต่างกันดังรูปที่ 1.12



รูปที่ 1.12 แสดงกระบวนการโม่แป้งข้าวโพด(Corn wet milling process) ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆออกมา (Food and Agricultural Industrial,www.epa.gov/ttn/chief/ap42/ch09/final/c9s09-7.pdf)

ตารางที่ 1.5 ส่วนประกอบของน้ำแช่ข้าวโพด (Filipovic et al., 2002)

(%) in dry matter	Corn steep	Condensed corn steep
Dry matter	5.27	49.74
Crude protein	50.84	45.64
Protein nitrogen	1.511	1.28
Non protein nitrogen	6.62	6.02
Alfa amino nitrogen	2.60	1.72
Ammonium nitrogen	6.61	0.60
Crude fat	-	-
Crude fiber	-	-
Mineral matters	18.24	17.05
Calcium	0.21	0.19
Phosphorus	3.02	2.15
Iron	0.03	0.003
Potassium	3.80	3.17
Sodium	0.14	0.10
Total sugar	5.65	3.31
Reducing sugar	3.50	2.54
Starch	-	-
SO_2	0.83	0.47
PH	3.94	4.25
Acidity as lactic acid	40.12	28.03
Acidity as HCl	16.26	11.36

สาร PHB เป็นสารที่โครงสร้างคล้ายคลึงกับ Polypropylene และมีสมบัติที่เหมือนกันคือ ทนความร้อน (thermoplastic) (Anderson et al., 1990) ซึ่งการศึกษาลักษณะโครงสร้างของสาร PHB และมวลโมเลกุลของ PHB ที่ได้จากการสกัดด้วย Chloroform ของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค NMR และGPC เพื่อหาโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร ซึ่งโครงสร้างและมวลโมเลกุลดังกล่าวนี้ จะมีผลต่อการนำสาร PHB ที่ได้ไปใช้ในด้านต่างๆ เช่น ถ้าสาร PHB ที่มีโมเลกุลสูงจะนำไปผลิตพลาสติกที่มีคุณภาพเช่นเดียวกับ Polypropylene หรือถ้าสาร PHB มีโมเลกุลต่ำจะนำไปใช้ในทางการแพทย์หรือเภสัชกรรมได้ดีกว่า Polypropylene เพราะสามารถที่จะนำย่อยสลายได้ในร่างกายได้

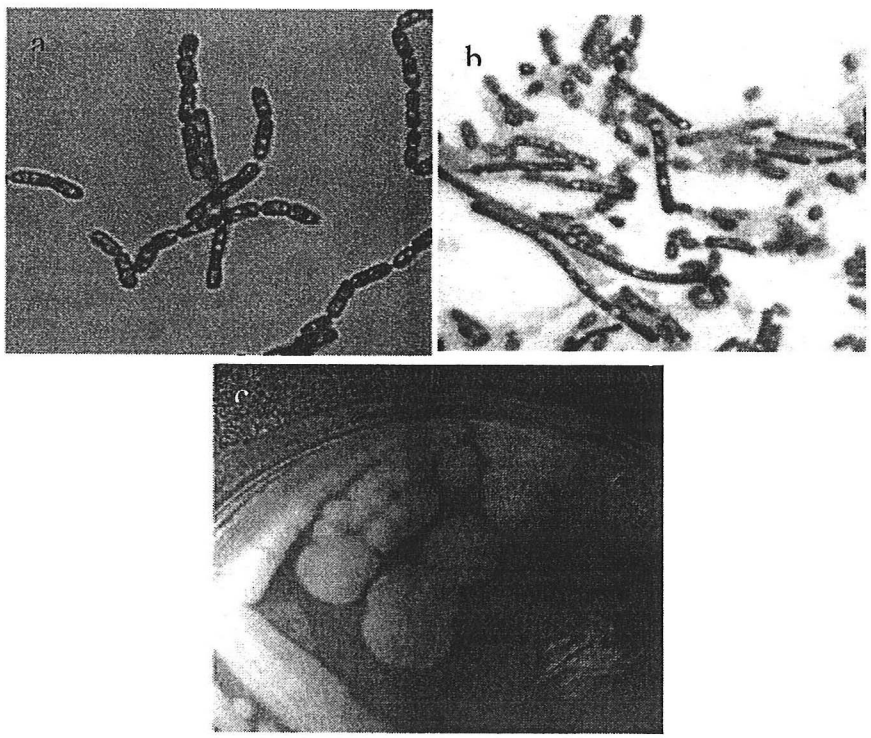
1.3.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต PHB

Bacillus megaterium

เป็นแบคทีเรียกลุ่มพวก Eubacteria (แบคทีเรียที่แท้จริง) มีรูปร่างท่อน (rod) และเป็นแบคทีเรียที่ใหญ่ที่สุดใน Eubacteria *Bacillus megatrium* เป็นแกรมบวก สามารถที่จะสร้างสปอร์ได้ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบได้ทั่วไปในดิน โคโลนีจะมีลักษณะเหนียวที่เกิดจากสายของ Polysaccharides บนผนังเซลล์ (รูปที่ 1.13)

Bacillus megaterium มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมมาก โดยสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อสังเคราะห์กรดอะมิโนได้ และ *Bacillus megaterium* มี Extrachromosomal DNA (Plasmid) ที่เสถียรอีกด้วย

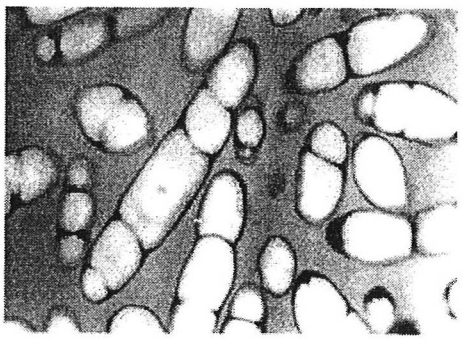
- Mega ในกรีก แปลว่า ใหญ่ (large)
- Teratis ในกรีก แปลว่า สัตว์ (monster, beast)
- Megaterium แปลว่า สัตว์ขนาดใหญ่



รูปที่ 1.13 แสดงลักษณะของ *Bacillus megaterium* a) rod shape b) Spore forming (green) c) Colonies (http://web.umr.edu/~microcio/BIO221_2000/Bacillus_megatrium.html)

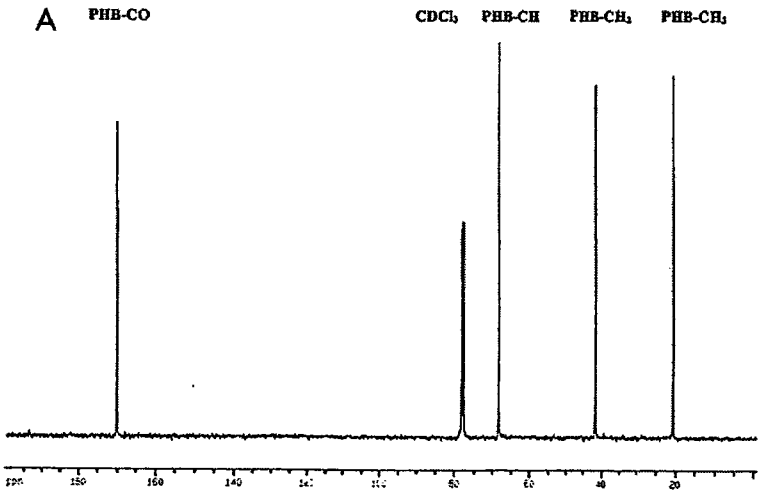
Alcaligenes eutrophus

แบคทีเรียใน genus Alcaligenes เป็นแบคทีเรียแกรมลบลักษณะรูปร่างเป็นท่อน (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) และใน genus นี้ มีแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *A. eutrophus, A. latus, A. Faecalis, A. paradoxus* เป็นต้น การควบคุมกระบวนการหายใจขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละชนิด แต่ส่วนใหญ่จะสามารถหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนได้ และในกระบวนการหายใจจะใช้ ไนเตรต และไนไตร ในกระบวนการรับ อิเลคตรอนตัวสุดท้าย แทนออกซิเจน *A. eutrophus* จัด เป็นchemoorganotrophic organisms ปกติจะใช้พลังงานคาร์บอนในการเจริญเติบโต genus Alcaligenes ถือว่าเป็นผลผลิตที่น่าสนใจในเทคโนโลยีชีวภาพ เพราะมันสามารถผลิตและเก็บพลาสติกได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่างในอุสาหกรรมพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ (Thomas J Klem, 1999) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษา gene ที่อยู่ใน *A. eutrophus* เพื่อนำไปพัฒนาการผลิต PHB ให้ได้ปริมาณมากขึ้นในเวลาที่สั้นลง (รูปที่ 1.14)

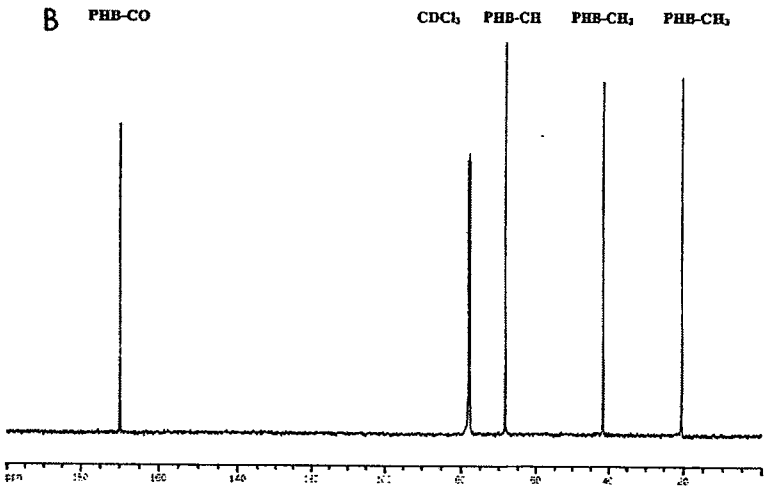


รูปที่ 1.14 ลักษณะทั่วไปของ Alcaligenes eutrophus
(http://microbewiki.kenyon.edu/index.php?title=Alcaligenes&oldid=54338)

ลักษณะของ Poly(3-hydroxybutyric acid) ที่สังเคราะห์จาก *A. eutrophus* และ *Escherichia coli* ลูกผสม Poly-3-hydroxyalkanoic acid (PHA) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ มีการสะสมมากในเซลล์ของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต PHA จะสังเคราะห์และสะสมในเซลล์เป็นเม็ดแกลนูลโดยมีเนื้อสารเป็น ไขมัน และโปรตีน PHA จะถูกย่อยสลายภายในเซลล์ใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การศึกษาลักษณะของ PHB จะศึกษาโดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) โดยใช้ตัวอย่าง PHB ที่สกัดได้จาก *A. eutrophus* และ *Escherichia coli* ลูกผสม เพื่อทำการเปรียบเทียบว่าโครงสร้างโมเลกุลของ PHB โดยใช้ผล NMR ของ *A. eutrophus* (รูปที่ 1.15) เป็นข้อมูลอ้างอิงและทำการเปรียบเทียบว่า PHB ที่ได้จาก *E. coli* ลูกผสม (รูปที่ 1.16) มีลักษณะใกล้เคียงกัน



รูปที่ 1.15 แสดงผลการวิเคราะห์โมเลกุล PHB ที่ได้จากเชื้อ *A. eutrophus* ด้วยเทคนิค ^{13}C NMR (Hahn et al., 1994)



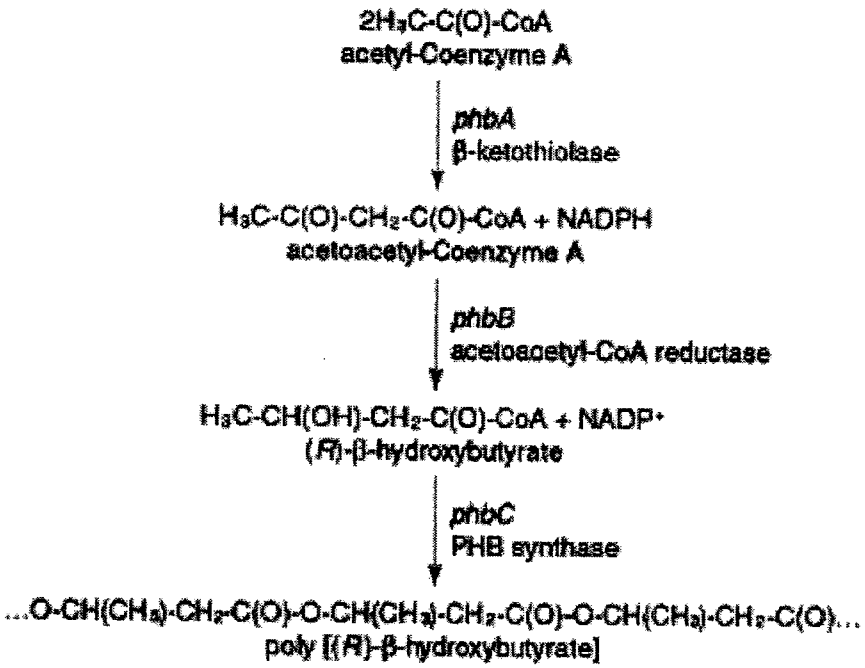
รูปที่ 1.16 แสดงผลการวิเคราะห์โมเลกุล PHB ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* ลูกผสมด้วยเทคนิค ^{13}C NMR

แบคทีเรียสกุล Alcaligenes เป็นแบคทีเรียแกมลบรูปท่อนในสกุลนี้มีทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *A. eutrophus, A. latus, A. Faecalis, A. paradoxus, A. piechaudii, A.xylosoxidans* ลักษณะการหายใจขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ถ้าเชื้อชนิดใดมีการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนก็จะใช้ ไนเตรต และไนไตร ในกระบวนการรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย แบคทีเรียนในสกุลนี้ต้องการพลังงานคาร์บอนในการเจริญเติบโตไม่ว่าจะเป็นชนิดอาศัยอยู่ในดิน ในน้ำ หรือที่ต่างๆในธรรมชาติ แต่เคยมีการพบในลำไส้ของสัตว์มีกระดูกสันหลังเนื่องจากเชื้อในสกุลนี้จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส แบคทีเรียสกุล Alcaligenes ถือว่าเป็นผลผลิตที่น่าสนใจ

ในเทคโนโลยีชีวภาพ เพราะมันสามารถผลิตและเม็ดพลาสติกได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่างในอุสาหกรรมพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้และนอกจากนี้ยังมีการศึกษา gene ที่อยู่ใน *A. eutrophus* เพื่อนำไปพัฒนาการผลิต PHB ให้ได้ปริมาณมากขึ้นในเวลาที่สั้นลง นอกจากนี้เชื้อในสกุลนี้ยังมีบทบาทในด้านอุสาหกรรมอาหารและการแพทย์ เพราะว่าเอนไซม์บางชนิดสามารถนำไปผลิตกรดอะมิโนในอุสาหกรรมอาหารได้ ในอีกด้านหนึ่งทางการแพทย์ยังสามารถนำเชื้อในสกุลนี้ไปใช้ในการศึกษาพยาธิวิทยาอีกด้วย PHB ถูกสังเคราะห์มาจากสารตั้งต้น acetyl-CoA โดยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ ß-ketothiolase, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase และPHB synthase เอนไซม์เหล่านี้จะถูกผลิตมาจากรหัสของจีน phbA, phbB และphbC ตามลำดับ (รูปที่ 1.17)

ตารางที่ 1.6 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิของ PHB ด้วยเทคนิค DSC

Polymer	T_g (°C)	T_{cc} (°C)	ΔH_{cc} ($J\,g^{-1}$)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	ΔH_m ($J\,g^{-1}$)	X_c
FC200-PHB	0.03	46.4	47.9	173.1	–	81.0	0.56
CC10-PHB	–	–	–	168.2	173.2	103.9	0.71
SC2-PHB	–	–	–	167.4	172.5	92.5	0.63
HC2-PHB	–	–	–	171.2	–	86.0	0.59
IS2-PHB	–	–	–	171.4	–	97.4	0.67



รูปที่ 1.17 แสดงแผนผังการสังเคราะห์ PHB โดยแบคทีเรียสกุล Alcaligenes

การวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุล Polyhydroxybutyric acid (PHB)

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ ส่วนประกอบ การกระจายตัวของ PHB และPHAs มีหลายวิธีและแตกต่างกันออกไป โดยทั่วไปแล้วจะใช้วิธี Spectrophotometric ของ Law และ Slepecky ซึ่งจะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนของพอลิเมอร์ไปเป็นกรดโครโทนิก(Crotonic acid) โดยความร้อนร่วมกับกรดซัลฟิวริก ส่วนวิธี Gas chromatography(GC) และ High-pressure liquid chromatography (HPLC) ก็ได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ PHAs เช่นกัน GC จะตรวจสอบหรือวิเคราะห์ PHB/PHAs ในรูปของ 3HB methyl ester และPHB ปริมาณน้อยประมาณ 10 ไมโครลิตรก็วิเคราะห์ได้ โดยวิธีต่างๆนี้เป็นวิธีการหลักในการวิเคราะห์ซึ่งสามารถที่จะนำไปประยุกต์หรือดัดแปลงได้

Riis และ Mai (1998) แนะนำวิธีการใหม่โดยใช้โพรพานอล และกรดไฮโดรคลอริก เพราะสารเหล่านี้สลายตัวน้อย Findlay และWhite (1998) สกัด PHAs จาก *B. megaterium* โดย Chloroform และวิเคราะห์ด้วยวิธี acid (HCl) Ethanolysis และ GC-Mass spectrometric (GC-MS) ซึ่งจะวิเคราะห์ PHB ในรูป 3-hydroxyalkanoic acid ethyl ester Karr และคณะ (1998) ใช้ ion exclusion(Aminax) high-pressure liquid chromatography เพื่อการวิเคราะห์ที่เร็วขึ้นของ PHB จาก *Rhizobium japonicum* โดยใช้การย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น เพราะวิธีนี้จะไม่สามารถวิเคราะห์ได้ถ้า PHB มีขนาดสายโมเลกุลที่ยาวกว่า 3HB Morikawa และ Marchessault ใช้ปฏิกิริยา Pyrolysis ของ PHAs ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 250 และ 600 องศาเซลเซียส โดย GC-MS ของอนุพันธ์ trimethylsiyl ซึ่ง PHAs สายสั้นๆจะถูกจำแนกเป็น โมโนเมอร์ ไดเมอร์ ไตรเมอร์ หรือลักษระของโคพอลิเมอร์ได้ Grassie และคณะ ใช้หลักการ pyrolysis เช่นกันแต่ดัดแปลงให้ได้ผลเร็วขึ้น โดยใช้ rapid pyrolysis-capillary GC ที่ถูกพัฒนาโดย Helleur ซึ่ง PHA จะเปลี่ยนเป็น Crotonic acid และ Isocrotonic acid และในทางตรงกันข้ามโคพอลิเมอร์จะถูกเปลี่ยนเป็น Crotonic acid กับ trans-2-pentenoic acid เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์โดยใช้ Nuclear magnetic resonance (NMR) พบว่าผลเหมือนกัน

นอกจากนี้ควรระวังการจัดเรียงตัวใหม่ของสายโมเลกุล PHAs (oligomer PHAs) เมื่อพอลิเมอร์ได้รับความร้อนซึ่งทำให้มีการแปลผลไม่แน่นอน ซึ่งมีรายงานว่าการวิเคราะห์ด้วย fast-atom-bombardment MS ของ PHAs จากปฏิกิริยา methanolysis บางส่วน ดีกว่า วิธีวิเคราะห์ด้วย direct pylolysis-MS และ fast-atom-bombardment MS ของ PHAs จากปฏิกิริยา pylolysis บางส่วน เมื่อรายละเอียดโครงสร้างนั้นแสดงออกมา อย่างไรก็ตามค่าจากการวิเคราะห์ด้วย fast-atom-bombardment MS ของ PHAs จากปฏิกิริยา pylolysis บางส่วน ก็ยังถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้

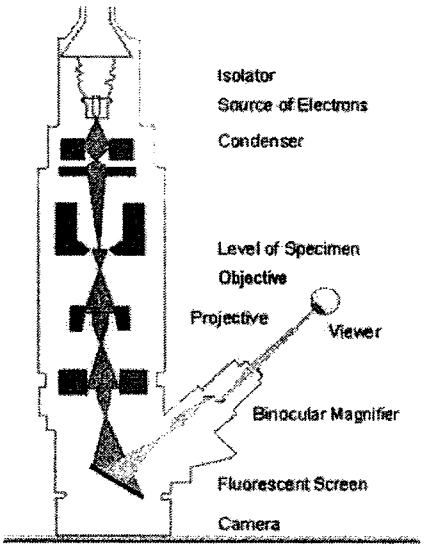
ลักษณะคอนฟอร์เมชันของโครงสร้างของ PHAs (conformational structure) ในสารละลายจะถูกศึกษาโดยวิธี วัดความหนืด (Viscometry) วัดการกระจายตัวของแสง (Light scattering) Optical rotatory dispersion และ ^{1}H NMR ซึ่งทำให้สรุปว่าโครงสร้างมีลักษณะเกลียวในสารละลาย Chloroform

NMR ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี โดย ^{1}H NMR spectra สามารถที่จะกำหนดส่วนประกอบของพอลิเมอร์ได้ ส่วน ^{13}C NMR สามารถที่จะทำนายลักษณะการกระจายตัวของโมโนเมอร์ได้จากลำดับของ diad และ triad Jacob และคณะ แสดงถึงผลของการขึ้นลงของ ^{13}C NMR spectra ของ PHB ที่ได้มาจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ LBr ซึ่งเหมือนกับ PHB ที่สกัดจาก *A. eutrophus* ที่ใช้วิธีวิเคราะห์แบบของแข็ง (Solid-state technique) โดย Doi และคณะ (1998) (Anderson et al.,1990)

Transmission microscopy (TEM)

ในอดีตการศึกษาลักษณะของเซลล์ จะใช้กล้องจุลทรรศน์แสง ซึ่งสามารถศึกษาด้วยกำลังขยายที่ไม่สูงมาก ตามลักษณะของความยาวคลื่นแสง และโฟตรอน (Photon) หรือประมาณ 400–700 นาโนเมตร แต่อิเล็กตรอนเป็นทั้งคลื่น และอนุภาคขนาดเล็กที่เล็กกว่าแสงหรือโฟตรอน ลักษณะดังกล่าวจึงนำมาใช้ในสร้างกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยใช้ลักษณะของลำแสงอิเล็กตรอนหรือรังสีอิเล็กตรอนมาราสามาผ่านวัตถุบางๆได้ โดยการสร้างอิเล็กตรอนจะให้หลักของ Thermionic discharge โดยบริเวณของลำแสงอิเล็กตรอนจะถูกควบคุมให้เป็นโฟกัสด้วยสนามแม่เหล็ก (magnetic lens) และปรับกำลังขยายได้ที่ magnetic lens เช่นกัน (รูปที่ 1.18)

ส่วนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาต้องมีการย้อมด้วยสารพวกโลหะหนักก่อน เช่น ออสเมียม ตะกั่ว หรือยูเรเนียม ซึ่งทำให้ลำแสงอิเล็กตรอนผ่านไม่ได้ และโลหะหนักนี้จะไปจับส่วนของโครงสร้างต่างๆภายในเซลล์แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้ปรากฏเป็นรูปโครงสร้างต่างๆของเซลล์ปรากฏลงบนจอเรืองแสง หรือฟิล์มถ่ายรูป โดยลักษณะภาพที่เห็นจะเป็นขาวดำ (http://en.wikipedia.org/wiki/TEM)



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

รูปที่ 1.18 แสดงหลักการของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission microscopy ,TEM) (www.universe-review.ca)

การหาน้ำหนักโมเลกุลของ PHAs

Gel permeation chromatography (GPC) กับสารละลาย Chloroform ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้ชุดคอลัมน์ microstyragel (set of five microstyragel column) ได้ถูกนำมาใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของ PHAs โดย Barham และคณะ (1998) ซึ่งใช้หาน้ำโมเลกุลของ PHB จาก *A. eutrophus* โดยใช้ Polystyrene เป็นสารมาตรฐาน ผลที่ออกมาจะเป็นความสัมพันธ์ของ Mark Houwink (Mark Houwink relationship) (Anderson et al.,1990)

$[\eta] = KM^{\alpha}$ เมื่อ $[\eta]$ คือ ค่าความหนืดที่แท้งจริง

M คือ มวลโมเลกุล

K และ α คือ ค่าคงที่การรวมบางส่วนของการละลายและอุณหภูมิ

สาร PHB เป็นสารที่โครงสร้างคล้ายคลึงกับ Polypropylene และมีสมบัติที่เหมือนกันคือ ทนความร้อน (thermoplastic) (Anderson et al., 1990) แต่ถูกย่อยสลายในธรรมชาติได้โดยจุลินทรีย์ย่อยสลาย และมีประสิทธิภาพทางการแพทย์ มีสมบัติการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) และในแง่ของระบบนิเวศวิทยาก็ยังสามารถลดมลภาวะในธรรมชาติได้อีกด้วย เนื่องจากสาร PHB สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ซึ่งการศึกษาลักษณะโครงสร้างของสาร PHB และมวลโมเลกุลของ PHB ที่ได้จากการสกัดด้วย Chloroform ของเชื้อ Bacillus megaterium ด้วย NMR และGPC เพื่อหาโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร ซึ่งโครงสร้างและมวลโมเลกุลดังกล่าวนี้ จะมีผลต่อการนำสาร PHB ที่ได้ไปใช้ในด้านต่างๆ เช่น ถ้าสาร PHB ที่มีโมเลกุลสูงจะนำไปผลิตพลาสติกที่มีคุณภาพเช่นเดียวกับ Polypropylene หรือถ้าสาร PHB มีโมเลกุลต่ำจะนำไปใช้ในทางการแพทย์หรือเภสัชกรรมได้ดีกว่า Polypropylene เพราะสามารถย่อยสลายในร่างกายได้

ในการศึกษานี้มุ่งศึกษาถึงการผลิตสาร PHB ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมคือ กากน้ำตาล และน้ำแช่ข้าวโพด ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ โดยจะศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ อัตราการผลิตสาร PHB และคุณสมบัติของ PHB ที่แตกต่างกันสาเหตุอาจเนื่องมาจาก ชนิดของอาหารเลี้ยงและปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันไป เพื่อหาความเป็นไปได้ในการผลิตสาร PHB เชิงพานิชย์ และในการศึกษานี้ยังรวมถึงลักษณะการสะสมสาร PHB ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์