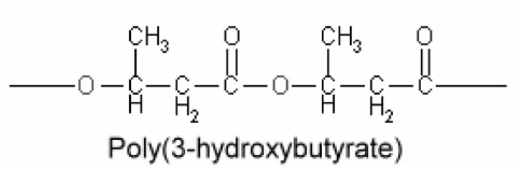
บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

2.1 Poly-β-hydroxybutyrate (PHB)

พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทีเรต เป็นอนุพันธ์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทอะลิฟาติกโพลีเอสเทอร์ (Aliphatic polyester) มีโครงสร้างเป็นสายยาว (ภาพที่ 1) และมีคุณสมบัติต่างๆคล้ายกับพลาสติกทั่วไป เช่น โพลีโพรไพลีน (Polypropylene; PP) จากคุณสมบัติข้างต้นทำให้พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทีเรตมีความยืดหยุ่น และสามารถนำมาหลอมเพื่อขึ้นรูปและใช้ใหม่ได้อีกครั้ง (ตริตาภรณ์ และ พรเทพ, 2553 อ้างถึงใน Taguchi and Doi, 2004)

PHB ถูกค้นพบโดย Maurice Lemoigne นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศส เมื่อปี ค.ศ. 1926 ในเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* (Scholz, 2010 อ้างถึง Lemoigne, 1926) ปัจจุบันมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ไว้ภายในเซลล์ เช่น *A. eutropus* (Turesin *et al*., 2000), *C. necator* (Koutinas *et al*., 2007) และ *A. latus* (Grothe *et al*., 1999) เป็นต้น



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของ PHB

ที่มา : ตริตาภรณ์ และ พรเทพ (2553) อ้างถึง Turesin *et al*. (2000)

2.2 คุณสมบัติทั่วไปของพอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต (ศิริวรรณ, 2552)

2.2.1 PHB ไม่สามารถละลายน้ำและต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ทำให้ PHB ต่างจากพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น

2.2.2 PHB สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตร้าไวโอเลตและออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี แต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำ

2.2.3 PHB ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ

2.2.4 PHB มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible) ทำให้สามารถนำไปใช้ผลิตพลาสติกที่ใช้ในทางการแพทย์ได้

2.2.5 PHB มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานซิสชัน 15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 Mpa ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์

2.2.6 PHB สามารถจมน้ำได้ทำให้ถูกย่อยสลายในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศได้

นอกจากคุณสมบัติต่างๆ ของสาร PHB ที่กล่าวมานี้แล้ว PHB ยังมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีนซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของโพลีโพรไพลีน (PP) และพอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต (P3(HB))

Parameter	Polypropylene(PP)	P(3HB)
Melting point Tm [^{o}C]	171-186	171-182
Glass Transition Temperature Tg [^{o}C]	-15	5-10
Crystallinity [%]	65-70	65-80
Density [g cm^{-3}]	0.905-0.94	1.23-1.25
Molecular weight Mw (x 10^{-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

Parameter	Polypropylene(PP)	P(3HB)
Extension to break [%]	400	6-8
UV resistance	poor	good
Solvent resistance	good	poor
Oxygen permeability [$cm^{-3}m^{-2}atm^{-1}d^{-1}$]	1700	45
Biodegradability	-	good
Other	Due to low density floats in aquatic system	Due to more density goes to the sediment in aquatic system

ที่มา : ตริตาภรณ์ และ พรเทพ (2553) อ้างถึง Khanna and Srivastava (2005)

2.3 การใช้ประโยชน์จากพอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากคุณสมบัติของโพลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย (ตริตาภรณ์ และ พรเทพ, 2553) เช่น

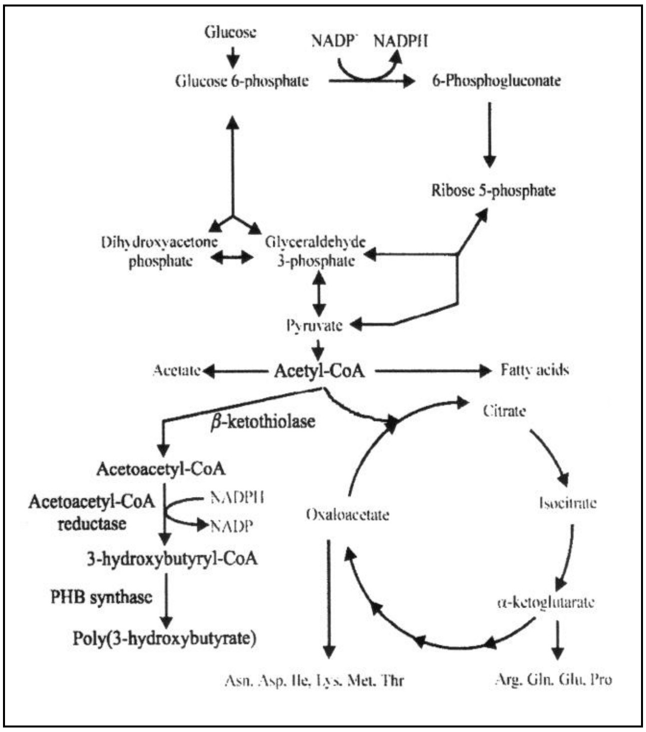
2.3.1 ด้านการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผล (Sutures) ตัวเย็บแผล (Staples) วัสดุปิดแผล (Wound dressing) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (Surgical implants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (Orthopedic fixation devices) วัสดุนำพาหรือสำหรับปล่อยตัวยาซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปล่อยตัวยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.3.2 ด้านการเกษตร เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้ม และปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด

2.33 ด้านบรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิมล์สำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษ

2.4 การสังเคราะห์ PHB

วิถีการสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle) โดยเริ่มต้นจากการสร้างอะซิทิลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ (Hydroxylbutyryl-CoA) ด้วยการทำงานของเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (Acetoacetyl-CoA reductase) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดขบวนการพอลิเมอไรเซชั่น (Polymerization) ของไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB ซินเทส (PHB Synthase) อย่างไรก็ตาม PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โพลิไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจิเนส (Polyhydroxybutyrate dehydrogenase) เมื่อพิจารณา PHB ที่อยู่ในเซลล์พบว่ามีลักษณะเป็น Granule โดยมี Monolayer phospholipid membrane ห่อหุ้มอยู่โดยพบว่ามีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการสลายแทรกกระจายอยู่โดยรอบ และการควบคุมการผลิต PHB นั้นพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ *phaCBA* cluster ซึ่งประกอบด้วย *phaA* *phaB* และ *phaC* โดย *phaA* เป็นส่วนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-ketothiolase ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลง acetyl-CoA ไปเป็น Acetoacetyl-CoA สำหรับ *phaB* เป็นยีนส่วนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ NADPH-oxidoreductase ซึ่งจะทำการเปลี่ยน Acetoacetyl-CoA ให้เป็น 3-hydroxylbutyryl-CoA และ *phaC* เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ PHB polymerase ซึ่งจะนำ 3-hydroxylbutyryl-CoA มาสร้างโพลิเมอร์จนได้ PHB (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วิถีการสังเคราะห์พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต

ที่มา **:** Reddy *et al*. (2003)

2.5 การสกัดแยกพอลิบีต้าไฮดรอกบิวทิเรต (PHB) และการทำให้บริสุทธิ์

PHB เป็นสารที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ดังนั้นการแยกพอลิเมอร์ของ PHB จึงต้องมีการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อน ทั้งนี้ในกระบวนการสกัดต้องไม่ทำให้คุณสมบัติของโพลิเมอร์เปลี่ยนแปลง และภายหลังการสกัดต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของ PHB ที่สกัดได้ก่อนนำไปใช้ต่อไป วิธีการสกัด PHB แบ่งได้ 3 วิธีคือ

2.5.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

การสกัด PHB ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เมทิลีนคลอไรด์ (Methyl chloride) เป็นวิธีที่ให้ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่สกัดออกมามีมวลโมเลกุลสูง PHB ที่สกัดได้ด้วยวิธีนี้จะมีสีขาวสามารถทำเป็นผลึกได้และมีมวลโมเลกุลสูง แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพราะต้องใช้สารสกัดในปริมาณมากแต่มีข้อดีคือ สกัดได้ง่าย และสามารถควบคุมความบริสุทธิ์ของโพลิเมอร์ให้สูงได้ (Lee, 1997)

2.5.2 การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochloride extraction)

การสกัดวิธีนี้เป็นวิธีที่ Williamson and Wikinson ใช้ในการแยกพอลิเมอร์ชนิดพอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรตในปี 1958 จากเชื้อ *Bacillus cereus* โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ย่อยสลายผนังเซลล์นาน 30 – 60 นาที จากนั้นนำโพลิเมอร์ที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการล้างด้วย ไดเอทิล อีเธอร์ (Diestyl ether) หรือเมธานอล (Methanol) เพื่อกำจัดไขมันออก และยังพบอีกว่าในการสกัดในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงจะทำให้สายพอลิเมอร์ของ PHB ถูกทำลายซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านพื้นผิวและโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ และการแช่เซลล์ในสารลดแรงตึงผิวก่อนทำการสกัดจะช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของสารถึง 95% แต่อย่างไรก็ตาม การสกัดโพลิเมอร์ด้วยวิธีนี้จะมีโซเดียมไฮโปคลอไรด์หลงเหลืออยู่กับโพลิเมอร์ซึ่งสามารถก่อให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อมได้

2.5.3 การสกัดด้วยเอนไซม์ (enzymatic extraction)

Doi (1990) ได้กล่าวถึงการพัฒนากระบวนการสกัดโพลิเมอร์โดยการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ว่าเป็นกระบวนการที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม โดยสามารถให้ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพในปริมาณที่สูง ซึ่งมีการใช้เอนไซม์หลายชนิดรวมกัน เช่น อัลคาเลส(Alcalase) ฟอสโฟไลเปส (Phospholipase) แลคซิเตส (Lacitase) และไลโซไซม์ (Lysozyme) เป็นต้น

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต

2.6.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต จากรายงานพบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กันจะทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย โดยจุลินทรีย์บางชนิดผลิตพอลิเมอร์ในรูปโฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer) และบางชนิดผลิตในรูปโคพอลิเมอร์ (Copolymer) เช่น เมื่อใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพอลิเมอร์ด้วย *A. eutrophus* R3 จะได้พอลิเมอร์ชนิดโคพอลิเมอร์ (P(3HB-co-3HV)) ขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วย *A. eutrophus* ATCC 17697 จะผลิตพอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์ (Anderson and Wynn, 1995)

Boman and Roth (1999) ทำการผลิต PHB จาก *Methyrobacterium rhodesianum* กับ *Ralathonia euthopha* ในอาหารเคซีนไฮโดรไลเซต ซึ่งมีการเติมกลีเซอรอลพบว่า *M. rhodesianum* สามารถผลิต PHB ได้ 39% โดยน้ำหนักโดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงประมาณ 92

ชั่วโมง ในระดับฟลาสก์ ขณะที่ทำการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์พบว่าที่เวลา 45 ชั่วโมง *M. rhodesianum* ผลิต PHB ได้สูงถึง 50% โดยน้ำหนักในขณะที่ *R. euthopha* สามารถผลิตได้ 47% โดยน้ำหนัก หลังการเลี้ยงประมาณ 47 ชั่วโมงในฟลาสก์ จากการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์เมื่อเวลา 45 ชั่วโมงสูงถึง 65% โดยน้ำหนัก

Patwardhan and Srivastava (2008) ได้ศึกษาการใช้ *Wautersia eutropha* NRRL B-14690 (ชื่อเดิมคือ *Alcaligenes euthropus*) ในการผลิต PHB โดยใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าได้ชีวมวลและ PHB สูงสุดเท่ากับ 14 และ 6.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสะสม PHB ในเซลล์เท่ากับ 43.6%

Kim and Chang (1995) ได้ศึกษาการใช้ *A. eutrophus* โดยใช้ tapioca hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิต PHB ด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ พบว่ามี PHB สะสมอยู่ 58% โดยน้ำหนักแห้ง คิดเป็นผลได้ของ PHB ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 0.33

2.6.2 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ในการสร้างพลังงานและสร้างส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ ในกระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมวัสดุทางการเกษตรที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีมากและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งจากธัญพืชชนิดต่างๆ แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง (สมใจ, 2001) โดยแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดนั้นจะมีผลต่อองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้ ดังนั้นในการผลิต จึงต้องศึกษาถึงชนิดและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

Ruan *et al.* (2003) ศึกษาการใช้น้ำตาลฟรุกโตสและกรดบิวทิริก (Butyric acid) เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* โดยใช้น้ำตาลฟรุกโตสและกรดบิวทิริกความเข้มข้น 20 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลฟรุกโตส *A. eutrophus* สามารถผลิตพอลิเมอร์ได้ให้ 12.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้กรดบิวทิริกสามารถผลิต PHB ได้ 2.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

Borman and Roth (1999) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. rhodesianum* ในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้ 39% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งใช้

เวลาในการผลิต 92 ชั่วโมง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักพบว่าสามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นเป็น 50% โดยน้ำหนักแห้ง

Yezza *et al.* (2007) ได้ศึกษาการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *A. latus* โดยใช้ maple sap ซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนประกอบหลักเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการทดลองในระดับฟลาสก์เขย่า พบว่าได้ ชีวมวลของ *A. latus* สูงสุดเท่ากับ 4.4±0.5 กรัมต่อลิตร และมี PHB สะสมอยู่ภายในเซลล์ 77.6±1.5 % โดยน้ำหนักแห้ง และเมื่อทำการศึกษาในถังหมักขนาด 20 ลิตร พบว่าได้ผลใกล้เคียงกับการทดลองในระดับฟลาสก์ โดยได้ชีวมวลของ *A. latus* เท่ากับ 4.2±0.3 กรัมต่อลิตร และมี PHB สะสมอยู่เท่ากับ 77.0±2.6 % โดยน้ำหนักแห้ง

Yu *et al.* (1999) นำ *A. latus* DSM 1124 มาใช้ในการผลิต PHB โดยใช้ของเหลือจากโรงงานผลิตเบียร์และโรงงานผลิตนมถั่วเหลืองมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งกะ พบว่าการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวได้ค่า PHB เท่ากับ 36.26% โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนการใช้ซูโครสและมอลต์จากโรงเบียร์เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิต PHB ได้ 70.69% โดยน้ำหนักแห้ง และการใช้ซูโครสและกากถั่วเหลืองจากโรงงานผลิตนมถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าได้ PHB เท่ากับ 32.57% โดยน้ำหนักแห้ง

Koutinas *et al.* (2007) ศึกษาการใช้ *C. necator* NCIMB 11599 ในการผลิต PHB จาก Wheat flour hydrolysates ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการสะสม PHB ได้ 0.36 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง โดยการสะสม PHB ในเซลล์ของ *C. necator* เกิดจากการจำกัดสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต

2.6.3 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์

2.6.3.1 แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก เช่น เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท ซึ่งเกลือแอมโมเนียม ที่มีราคาถูกที่สุดได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต

$((NH_4)_2SO_4)$ ซึ่งปกติจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรดเนื่องจาก เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไป จะเกิด SO_4^{-2} ขึ้น อาหารเลี้ยงเชื้อ ในทางตรงข้ามแก๊สแอมโมเนียและไนเตรทเมื่อถูกเมแทบอไลซ์ตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ในกรณีที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรทตามปกติในระยะแรก NH_4^+ จะถูกใช้ไปก่อน ทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรด จนกระทั่ง NH_4^+ หมดจุลินทรีย์จึงสังเคราะห์เอนไซม์ Nitrate reductase และใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Beaulieu *et al*., 1995)

2.6.3.2 แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนชนิดนี้อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย ก็ได้ โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน วัตถุดิบที่นิยมใช้เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง Distillers soluble casein hydrolysate และ Yeast extract เป็นต้น (สมใจ, 2001)

Grothe *et al*. (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อ *A. latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร (โมลคาร์บอนต่อโมลไนโตรเจนเท่ากับ 28.3) มีผลทำให้มีการผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 4.6 กรัมต่อลิตร

Kumar *et al*. (2004) ศึกษาการผลิต PHB จากกลุ่มตะกอนเร่ง (Activated sludge) ของโรงงานผลิตอาหารโดยใช้ความเข้มข้นตะกอนเร่งเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตรทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร และศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24 96 120 144 และ 168 (โมลต่อโมล) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นทำให้มีการสะสม PHB ในเซลล์มากยิ่งขึ้น โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 144 มีการสะสม PHB สูงสุดเท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง

Kim *et al*. (1994) ได้ทำการทดลองผลิต PHB ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* แบบกึ่งกะ (Fed-batch) โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและปริมาณไนโตรเจนให้อยู่ในช่วง 60-70 และ 10-20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า *A. eutrophus* สามารถผลิต

PHB ได้สูงขึ้นเท่ากับ 76% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นอัตราการผลิตและผลได้ของ PHB เท่ากับ 2.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.3 กรัม PHB ต่อกรัมกลูโคส ตามลำดับ

2.6.4 ฟอสฟอรัส อาหารเสริมและเกลือแร่

Ryu *et al*. (1997) ได้ศึกษาการผลิต PHB โดยเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* ในสภาวะที่มีปริมาณฟอสเฟสจำกัด มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง เท่ากับ6.8 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูง *A. eutrophus* จะผลิต PHB สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณเซลล์และ PHB สูงที่สุด

Grothe *et al*. (1999) ศึกษาผลของการเติมและไม่เติมธาตุอาหารรองต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *A. latus* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า การเติมธาตุอาหารรองได้แก่ $ZnSO_2{\cdot}7H_2O$ 0.1 กรัมต่อลิตร $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 0.01 กรัมต่อลิตร $NiSO{\cdot}7H_2O$ 0.02 กรัมต่อลิตร $CaCl_2{\cdot}6H_2O$ 10 กรัมต่อลิตร $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ 0.03 กรัมต่อลิตร Ammonium Fe (III) citrate 6 กรัมต่อลิตร ทำให้ *A. latus* มีการสร้างมวลเซลล์และ PHB เท่ากับ 6.8 และ 3.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.6.5 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB ของจุลินทรีย์โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrase synthase) และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจิเนส (Isocitrase dehydrogenase) จะถูกยับยั้งการทำงานโดยการสะสม Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) ทำให้ Acetyl Co A ไม่สามารถเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle) ได้ Acetyl-CoA จึงถูกเปลี่ยนไปเป็น Acetoacetyl-CoA และเข้าสู่การสังเคราะห์ PHB โดยการทำงานของเอนไซม์ Ketothiolase นอกจากนี้การมีปริมาณออกซิเจนจำกัดยังทำให้กระบวนการหายใจลดลงจุลินทรีย์จึงไม่สามารถย่อยสลายแหล่งคาร์บอนได้อย่างสมบูรณ์ จึงเกิดการสะสม PHB ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรองในสภาวะที่มีอาหารไม่สมบูรณ์ (Luengo *et al*., 2003)

2.6.6 พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ พบว่าการผลิตพอลิเมอร์จะเกิดได้ดีเมื่อควบคุมพีเอชเริ่มต้นที่ 7.0 ในขณะที่จากงานวิจัยของ Kinoshita *et al*. (1991) พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการเจริญของ *A. eutrophus* No. 4 โดยแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้สูงเมื่อพีเอชเริ่มต้นสูงกว่า 7.0

2.6.7 อุณหภูมิ

Yezza *et al.* (2007) ได้ศึกษาการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *A. latus* โดยใช้ Maple sap โดยทำการเพาะเลี้ยง *A. latus* ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียล ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ Yu *et al.* (1999) ใช้เพาะเลี้ยง *A. latus* DSM 1124 เพื่อศึกษาการผลิต PHB โดยทำการเพาะเลี้ยงใช้ที่ 35 องศาเซลเซียล

2.7 กระบวนการหมัก

การผลิตพีเอชบีนั้นสามารถใช้กระบวนการหมักได้หลายวิธี เช่น กระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation) (Koutinas *et al.*, 2007) การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation) (Patwardhan and Srivastava, 2008) และการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) (Tan *et al.,* 2011)

2.7.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation) เป็นการหมักในระบบปิดที่มีอาหารเริ่มต้นปริมาณจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหาร ในระยะแรกเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว เซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกว่าช่วง Lag phase หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีการเจริญเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ เรียกว่า ช่วง Log phase จากนั้นจุลินทรีย์ก็เริ่มหยุดการเจริญเติบโตและเข้าสู่ช่วง Stationary phase เนื่องจากจุลินทรีย์จะถูกจำกัดด้วยสารอาหารและสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น โดยหลังจากที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วไประยะหนึ่งแล้ว อัตราการเจริญก็จะค่อย ๆ ลดลง และหยุดการเพิ่มจำนวน โดยเมื่อใส่จุลินทรีย์แล้ว การหมักแบบกะนี้จะไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เพิ่มลงไปอีก ระบบนี้มีข้อดี คือ ปลอดจากการปนเปื้อน เนื่องจากทำในระบบปิด จุลินทรีย์มีโอกาสกลายพันธุ์ต่ำ และพลังงานในระหว่างการหมักน้อย แต่ก็มีข้อเสีย คือ ต้องใช้แรงงานจำนวนมากในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมการหมัก และการเก็บผลผลิต (กนกวรรณ และคณะ, 2553)

Quillaquaman *et al.* (2008) ศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHB จาก *Halomonas boliviensis* ด้วยกระบวนการหมักแบบกะ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ด้วยการหมักแบบกะพบว่าปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 และYeast extract ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB คือ 0.15, 0.20 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%, w/v) ตามลำดับ โดยได้ PHB และน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) เท่ากับ 69 โดยน้ำหนัก และ 3.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Yeast extract เป็น 1.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะได้ PHB และ CDW เพิ่มขึ้นเป็น 44 โดยน้ำหนัก และ 12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ต่อมาศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนต่อการ

ผลิต PHB โดยผันแปรอัตราการกวนที่ 800 900 และ 1000 รอบต่อนาที (rpm) พบว่าที่อัตราการกวน 900 rpm ได้ PHB และ CDW สูงสุดเท่ากับ 54 โดยน้ำหนัก และ 14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Yezza *et al.* (2007) ทำการหมักแบบกะของ *A. latus* เพื่อศึกษาการผลิต PHB ที่ใช้ Maple sap เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในถังหมักขนาด 10 ลิตร PHB ที่ผลิตขึ้นสูงสุดถึง 77 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หลังจากการบ่ม 27 ชั่วโมง

2.7.2 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed – batch fermentation) เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะ ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้เพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัด เรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งในการหมักถ้ามีการเติมสารอาหารเริ่มต้นมากเกินไปอาจจะผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เนื่องจากแรงดันออสโมติกได้ (Osmotic pressure) แต่มีข้อเสีย คือ เสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระหว่างการเติมสารอาหารและมีความเข้มข้นของสารอาหารมากเกินไป (กนกวรรณ และคณะ, 2553)

Quillaquaman *et al.* (2008) ศึกษา การผลิตพลาสติกชีวภาพ PHB จาก *Halomonas boliviensis* ด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ โดยผันแปรความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง *H. boliviensis* เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตจึงเติมอาหารใหม่ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูง (700 กรัมต่อลิตร) ลงไปในระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่าได้ PHB และ CDW เพิ่มขึ้นสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ 23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.7.3 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นการหมักที่มีการเติมอาหารใหม่ลงไปและถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกัน ซึ่งจะสามารถยืดระยะเวลาในการเจริญช่วง Log phase ได้โดยการเติมอาหารใหม่เข้าไปแทนในปริมาณเท่าเดิม จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเพิ่มได้อย่างต่อเนื่อง และถ้ามีการถ่ายอาหารเก่าออกและเติมอาหารใหม่ลงไปอย่างต่อเนื่องในปริมาณที่เหมาะสม จะทำให้เกิดสภาวะคงที่ (Steady state) จุลินทรีย์มีอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโต สามารถผลิตสารต่าง ๆ ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหารและปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จะเท่ากับปริมาณเซลล์ในอาหารเก่าที่ถ่ายออก (กนกวรรณ และคณะ, 2553)

การหมักแบบต่อเนื่องมีข้อดี คือ ได้ผลผลิตที่สูงและสามารถหมักได้เป็นเวลานานหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน แต่มีข้อเสีย คือ การควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะสมดุลทำได้ยากและมีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอก และการหมักเป็นเวลานานจะทำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ได้

2.8 ลักษณะทั่วไปของ *Alacligenes euthophus*

A. euthophus เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ศึกษาการผลิต PHB กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดนี้มีความสามารถที่จะสะสมสาร PHB ไว้ภายในเซลล์ได้มากถึงประมาณร้อยละ 80 โดยน้ำหนักเซลล์ *A. euthophus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งกว้างประมาณ 0.5 μm ยาวประมาณ 1.8-2.6 μm มีสีขาวหรือสีครีมและจะกลายเป็นสีน้ำตาลเมื่ออายุมากขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส พบได้ในดินและในน้ำ (Holding and Shewan, 1974)

A. euthophus สามารถสร้างและสะสม PHB ได้ โดยใช้แหล่งคาร์บอนง่ายๆ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส เป็นต้น และสามารถเพิ่มอัตราการผลิตได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ และจะสะสม PHB ในปริมาณมากเมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว และอยู่ภายใต้การเจริญที่มีสารอาหารไม่สมดุล เช่น เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในภาวะที่จำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน จึงมีการสะสม PHB โดย *A. euthophus* จะสะสม PHB ไว้ในลักษณะของเม็ดแกรนูล (Granule) สีขาว ซึ่ง PHB ที่สะสมอยู่ในแกรนูลจะมีขนาดต่างๆกัน ปัจจุบันนี้มีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB ได้หลายชนิด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB ได้

Organism	Cell conc. ($g\ l^{-1}$)	PHB conc. ($g\ l^{-1}$)	PHB content (%)	Productivity ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)
Azotobacter chroococcum	54	25	46	0.35
Haloferax mediterranei	10	6	60	1.03
Ralstonia eutropha	106	61	58	1.03

Organism	Cell conc. ($g\ l^{-1}$)	PHB conc. ($g\ l^{-1}$)	PHB content (%)	Productivity ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)
Recombinant *Escherichia coli*	31	25	80	0.48
Methylobacterium sp. ZP24	9.9	5.9	59.5	0.123
Pseudomonas cepacia	3.57	2	56	0.0167
Azotobacter vinelandii UWD	33	22	66	0.61
Alcaligenes latus	32.36	22.68	70.69	0.44
Alcaligenes eutrophus NCIMB 11599		5.40		0.12
Alcaligenes eutrophus DSM 545			69	0.2

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kim. (2000)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yezza *et al.* (2007) ได้ศึกษาการผลิต poly-β-hydroxybutyrate (PHB) จากแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* โดยใช้ Maple sap ซึ่งมีซูโครสเป็นส่วนประกอบหลักเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการทดลองในระดับ ฟลาสก์เขย่า พบว่าได้ ชีวมวลของ *A. latus* สูงสุดเท่ากับ 4.4±0.5 กรัมต่อลิตร และมี PHB สะสมอยู่ภายในเซลล์ 77.6±1.5 % โดยน้ำหนัก และเมื่อทำการศึกษาในถังหมักขนาด 20 ลิตร พบว่าได้ผลใกล้เคียงกับการทดลองในระดับฟลาสก์ โดยได้ชีวมวลของ *A. latus* เท่ากับ 4.2±0.3 กรัมต่อลิตร และมี PHB สะสมอยู่เท่ากับ 77.0±2.6 %

Yu *et al.* (1999) ได้ใช้ *A. latus* DSM 1124 มาใช้ในการผลิต PHB โดยใช้ของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งกะ พบว่าการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวได้ค่า PHB 36.26% โดยน้ำหนัก ส่วนการใช้ซูโครสและมอลต์จาก

โรงเบียร์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ PHB 70.69% โดยน้ำหนัก และการใช้ซูโครสและกากถั่วเหลืองจากโรงงานผลิตนมถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าได้ PHB 32.57% โดยน้ำหนักแห้ง

Koutinas *et al*. (2007) ได้ศึกษาการใช้ *C. necator* NCIMB 11599 (ปัจจุบันคือ *Wautersia eutropha*) มาใช้ศึกษาการผลิต PHB โดยใช้ Wheat flour hydrolysates ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการสะสม PHB ได้ 0.36 % โดยน้ำหนักแห้ง โดยการสะสม PHB ในเซลล์ของ *Cupriavidus necator* เกิดจากการจำกัดสารอาหารจึงสามารถเจริญเติบโตได้โดยมีความเข้มข้นของกลูโคสน้อยกว่า 10 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่ากลูโคสมีความสำคัญในการผลิต PHB

Patwardhan and Srivastava (2008) ได้ศึกษาการใช้ *W. eutropha* NRRL B-14690 ในการผลิต PHB โดยใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยวิธีการหมักแบบกะ พบว่าได้มวลสูงสุดและความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 14 กรัมต่อลิตร และ 6.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ PHB ของเซลล์คือ 43.6%

Oliveira *et al.* (2007) ได้ศึกษาการใช้ *C. necator* DSM 545 โดยใช้ soy cake เป็นแหล่งคาร์บอน และเติม Supplement medium เพิ่มในอาหาร พบว่าการเติม Supplemented medium และกากน้ำตาล ให้ผลผลิต PHB 33.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สูงกว่าการไม่เติม non-supplemented medium ซึ่งได้ PHB เท่ากับ 14.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แสดงว่าใน Supplemented medium มีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงส่งผลทำให้แบคทีเรียมีการสะสม PHB ขึ้น

Kim and Chang (1995) ได้ศึกษาการใช้ *A. eutrophus* โดยใช้ Tapioca hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิต PHB ด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ พบว่าได้ค่า PHB สะสมอยู่ 58% โดยน้ำหนักแห้ง ได้ค่า yield เท่ากับ 0.33 (กรัม PHB ต่อกรัมสารตั้งต้น)