บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก

พลาสติก (Plastic) มาจากรากศัพท์ภาษากรีกว่า "plastikos" หมายความว่าหลอมหรือหล่อเป็นรูปร่างได้ง่าย ลักษณะที่เด่นชัดของพลาสติกอยู่ตรงที่โมเลกุลของพลาสติกมีขนาดใหญ่กว่าสารอื่นๆ มาก พลาสติกที่ใช้ส่วนใหญ่ได้จากปฏิกิริยาสังเคราะห์ทางเคมี ส่วนพลาสติกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติและใช้มากคือ เชลแล็ก (shellac) เป็นสารจากธรรมชาติที่ได้จากการแปรรูปเรซินหรือสารคัดหลั่งที่ได้จากแมลงครั่ง (สมชาย พวงเพิกศึก และ ชูศักดิ์ แช่มเกษม, 2518) พลาสติกเป็นสารประกอบอินทรีย์ สารอินทรีย์หมายถึงสารซึ่งในโมเลกุลมีธาตุไฮโดรเจน และคาร์บอนรวมกันอยู่ อาจมีเพียงอะตอมของธาตุทั้งสองหรือมีอะตอมของธาตุอื่นรวมอยู่ด้วย เช่น มีเทน (CH_4) เป็นสารอินทรีย์ที่มีแต่อะตอมของไฮโดรเจน และคาร์บอน กรดอะซิติก (CH_3COOH) มีอะตอมของไฮโดรเจน คาร์บอน และออกซิเจนรวมอยู่ด้วย เป็นต้น พลาสติกเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถนำมาหล่อเป็นรูปร่างต่างๆ ตามแบบ โดยใช้ความร้อนและแรงอัดเพียงเล็กน้อย มีจุดหลอมเหลวระหว่าง 80-350 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของพลาสติก (นิทัศน์ จิระอรุณ, 2543)

2.2 ประเภทของพลาสติก

พลาสติกแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ เทอร์โมพลาสติก และ เทอร์โมเซตติงพลาสติก (สารานุกรมเสรี, 2548)

2.2.1 เทอร์โมพลาสติก

เทอร์โมพลาสติก หรือเรซิน เป็นพลาสติกที่ใช้กันแพร่หลายที่สุด เมื่อได้รับความร้อนจะอ่อนตัว และเมื่อเย็นจะแข็งตัว สามารถเปลี่ยนรูปได้ พลาสติกประเภทนี้โครงสร้างโมเลกุลเป็นโซ่ตรงยาว มีการเชื่อมต่อระหว่างโซ่พอลิเมอร์น้อยมาก จึงสามารถหลอมเหลว หรือเมื่อผ่านการอัดแรงมากจะไม่ทำลายโครงสร้างเดิม เมื่อหลอมเหลวแล้วสามารถนำมาขึ้นรูปกลับมาใช่ใหม่ได้ ชนิดของพลาสติกในตระกูลเทอร์โมพลาสติก ได้แก่ พอลิเอทิลีน (Polyethylene; PE) พอลิ

โพรพิลีน (Polypropylene; PP) พอลิสไตรีน (Polystyrene; PS) แซน (styrene-acrylonitrile; SAN) เอบีเอส (Acrylonitrile-butadiene-styrene; ABS) พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride; PVC) ไนลอน (Nylon) พอลิเอทิลีน เทอร์ฟะธาเลต (polyethylene terephthalate; PET) และพอลิคาร์บอเนต (Polycarbonate; PC)

2.2.2 เทอร์โมเซตติงพลาสติก

เทอร์โมเซตติงพลาสติก (thermosetting plastic) เป็นพลาสติกที่มีสมบัติพิเศษ คือ ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและทนปฏิกิริยาเคมีได้ดี เกิดคราบและรอยเปื้อนได้ยาก คงรูปหลังการผ่านความร้อนหรือแรงดันเพียงครั้งเดียว เมื่อเย็นลงจะแข็งมาก ทนความร้อนและความดัน ไม่อ่อนตัวและเปลี่ยนรูปร่างไม่ได้ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงจะแตกและไหม้เป็นขี้เถ้าสีดำ พลาสติกประเภทนี้โมเลกุลจะเชื่อมโยงกันเป็นร่างแหจับกันแน่น แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแข็งแรงมาก จึงไม่สามารถนำมาหลอมเหลวได้ กล่าวคือ เกิดการเชื่อมต่อข้ามไปมาระหว่างสายโซ่ของโมเลกุลพอลิเมอร์ (cross linking among polymer chains) เหตุนี้หลังจากพลาสติกเย็นจนแข็งตัวแล้วจะไม่สามารถทำให้อ่อนได้อีกโดยใช้ความร้อน หากแต่จะสลายตัวทันทีที่อุณหภูมิสูงถึงระดับ การทำพลาสติกชนิดนี้ให้เป็นรูปลักษณะต่างๆ ต้องใช้ความร้อนสูง และโดยมากต้องการแรงอัดด้วย เทอร์โมเซตติงพลาสติก ได้แก่ เมลามีน ฟอร์มาลดีไฮด์ (melamine formaldehyde) ฟีนอลฟอร์มาดีไฮด์ (phenol-formaldehyde) อีพ็อกซี (epoxy) พอลิเอสเทอร์ (polyester) ยูรีเทน (urethane) และพอลิยูรีเทน (polyurethane)

2.3 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic)

มีการให้คำนิยามของคำว่า "biodegradable plastic" หลายๆ นิยามจนเมื่อ American Society for Testing and Materials (ASTM) สรุปเป็นมาตรฐานและให้คำนิยามของพลาสติกประเภทนี้ว่าเป็น "พลาสติกที่ย่อยสลายได้ โดยการย่อยมีผลมาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ หรือสาหร่าย เป็นต้น" (Raghavan, 1995) ซึ่งพลาสติกประเภทนี้มีหลายชนิด ทั้งที่เกิดในธรรมชาติและเป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่มีการใส่สารเติมแต่ง ได้แก่

2.3.1 พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีการใส่สารเติมแต่ง (additive based polymer)

ได้แก่ PE PP PS ที่มีการใส่สารเติมแต่งธรรมชาติบางชนิด เช่น แป้งจากข้าวโพด ข้าวโพด และเซลลูโลส เป็นต้น (Evans และ Sikdar, 1990; Raghavan, 1995) เมื่อพลาสติกเหล่านี้ถูกทิ้งในธรรมชาติ จุลินทรีย์จะย่อยสารเติมแต่งมีผลให้พลาสติกมีความอ่อนตัวลง มีรูพรุนและพื้นที่ผิวมากขึ้น โลหะหรือน้ำที่มีอยู่ในดินจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นทำให้สายของพอลิเมอร์ขาดและน้ำหนักโมเลกุลลดลง (Johnson และคณะ, 1993)

2.3.2 พลาสติกที่ถูกสลายตัวโดยแสงอัลตร้าไวโอเล็ต (UV degradable plastic)

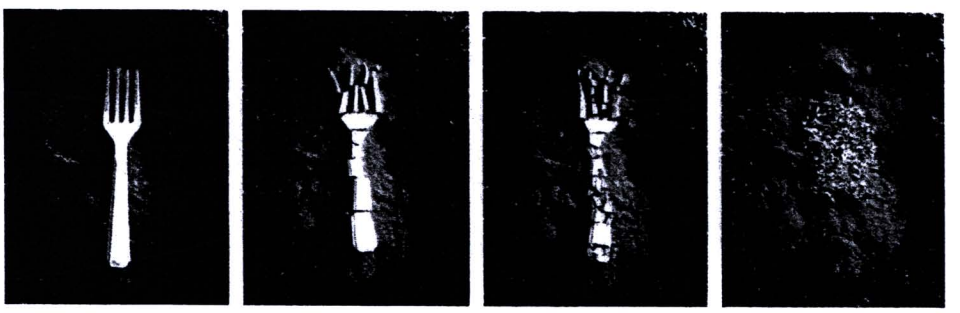
เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีหมู่คาร์บอนิล (C=O) เป็นองค์ประกอบซึ่งมีความไวสูงต่อแสงอัลตร้าไวโอเล็ต ทำให้เกิดการแตกตัวของสายพอลิเมอร์ทำให้พลาสติกกรอบและแตกได้ หรือมีการเติมสารแต่งเติมชนิดที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำลายพอลิเมอร์เมื่อได้รับแสงอัลตร้าไวโอเลต เช่น เหล็ก และทองแดง เป็นต้น (Brandl และคณะ, 1990)

2.3.3 พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ (microbial polymer)

เป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ โดยถูกสร้างและสะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด พอลิเมอร์ดังกล่าวได้แก่ พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate; PHA) ซึ่งจัดเป็นเทอร์โมพลาสติก หมายถึงมีสมบัติที่สามารถนำมาขึ้นรูปได้เมื่อได้รับความร้อน และเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้โดยตรงด้วยเอนไซม์บางชนิด เช่น เอสเทอเรสหรือดีพอลิเมอเรสจากจุลินทรีย์ ได้สารที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ต่อไป จึงจัดเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (Evans และ Sikdar, 1987; Brandl และคณะ, 1990)

ขยะพลาสติกที่ผลิตมาจากปิโตรเคมีปัจจุบันมีการสะสมในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น พบว่าทั่วโลกมีการใช้พลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีมากขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 1.5 ล้านตันในปี 1950 เป็น 245 ล้านตันในปี 2008 (Chanprateep, 2010) นักวิจัยได้ศึกษา วิจัยและพัฒนาพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น เช่น PHA (Verlinden และคณะ, 2007) พอลิแลคไทด์ (Polylactide; PLA) อะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) พอลิแซกคาไลน์ (Polysaccharides) เป็นต้น ในกลุ่มพอลิเมอร์ที่กล่าวมาพบว่า PHA มีคุณสมบัติด้านต่างๆ ที่

ใกล้เคียงกับพลาสติกที่ผลิตมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีมากที่สุด (Howell, 1982) มีคุณสมบัติทางกายภาพเป็นเทอร์โมพลาสติก และมีความยืดหยุ่น อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ภายใต้ภาวะที่แตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายภายในระยะเวลา 1 ปี (Cavalheiro และคณะ, 2009)

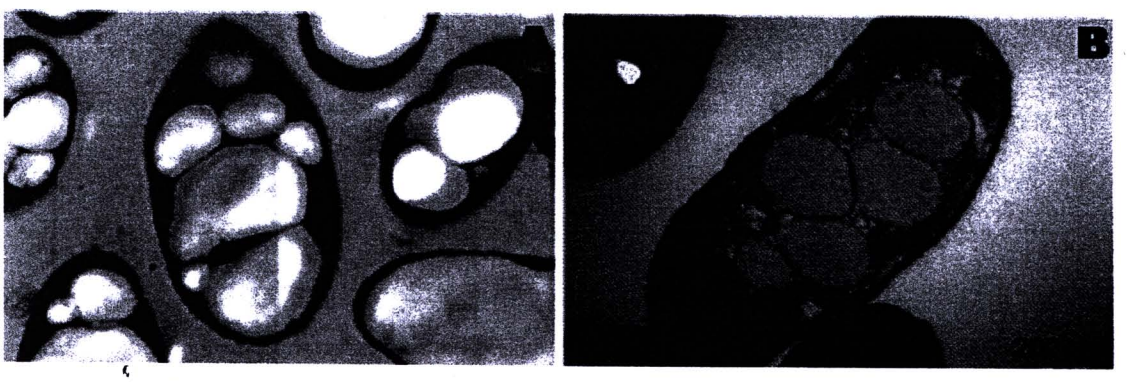


รูปที่ 2.1 แสดงการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพที่ผลิตมาจาก PHA ภายในระยะเวลา 45 วัน
ที่มา : www.hdb.hr/bec2008/PDF_files/Braunegg_pha.pdf (Accessed 3 August 2010)

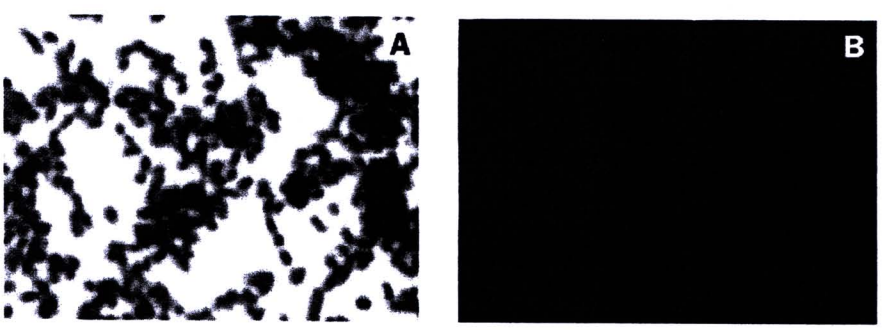
2.4 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA)

PHA เป็นพอลิเอสเทอร์ชีวภาพที่จุลินทรีย์บางชนิดสร้างและสะสมภายในแกรนูลในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของเซลล์ ภายใต้ภาวะที่จำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ออกซิเจน แมกนีเซียม เป็นต้น แต่จะต้องมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ (Anderson และ Dawes, 1990; Doi , 1990; Steinbüchel, 1991; Reddy และคณะ, 2003) จำนวนและขนาดของแกรนูลในหนึ่งเซลล์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ จากการรายงานของ Byrom (1994) พบว่า *Cupriavidus necator* (ชื่อเดิม *Alcaligenes eutrophus*) ในหนึ่งเซลล์จะมีจำนวนแกรนูล 8-13 แกรนูล มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5 μm ซึ่งจะดูได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน PHA สามารถถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีเอนไซม์เอสเทอเรสและดีพอลิเมอเรส ผลจากการย่อยสลายได้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม ได้แก่ กรดคาร์บอกซิลิก คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ (Evans และ Sikdar, 1990; Brandl และคณะ, 1990; Lee, 1996b) Lee (1996b) ได้กล่าวว่า PHA มีโมโนเมอร์ที่มากกว่า 300 ชนิดที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA (Lee, 1996b) เช่น *Alcaligenes* sp. *Acinetobacter* sp. *Azotobacter* sp. *Bacillus* sp. *Burkholderia* sp. *Corynebacterium*

sp. *Escherichia* sp. *Pseudomonas* sp. *Paracoccus* sp. *Rhodobacter* sp. *Rhodococcus* sp. *Rhodopseudomonas* sp. *Thermus* sp. เป็นต้น (Lu และคณะ, 2009)



รูปที่ 2.2 (A) ภาพถ่ายแกรนูลที่มีการสะสม PHA ของ *Cupriavidus necator* DSM 545 โดยเลี้ยงในถังหมักแบบต่อเนื่องที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) กำลังขยาย 150,000 เท่า (Koller และคณะ, 2010) (B) ภาพตัดแกรนูลที่มีการสะสม PHA ของ *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 โดยมีน้ำมันเมล็ดป่อ (linseed oil) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน TEM (Bassas และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.3 แกรนูลของแบคทีเรียที่ย้อมด้วย (A) Sudan Black B และ (B) Nile Blue A (López-Cortés และคณะ, 2008)

การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการย้อมสีของสารประเภทไขมันที่อยู่ภายในเซลล์เนื่องจากแกรนูลที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ได้เป็นสารประเภทไขมันชนิดหนึ่ง เช่น การย้อมด้วย Sudan Black B และ Nile Blue A การย้อมด้วย Sudan Black B เป็นการทดสอบเบื้องต้นซึ่งสามารถส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั่วไปได้โดยจะเห็นแกรนูลเป็นจุด

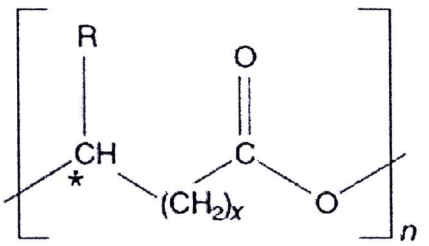
สีดำภายในเซลล์ ส่วนการย้อมด้วย Nile Blue A จะเห็นแกรนูลเป็นจุดสีแดงหรือสีส้มภายใต้กล้องฟลูออเรสเซ็นต์ (Song และคณะ, 2008)

PHA ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำรองให้กับเซลล์ จึงหมายความว่าจุลินทรีย์จะสลาย PHA เพื่อดึงคาร์บอนที่สำรองไว้กลับไปใช้ในการเจริญเติบโตเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลนแหล่งคาร์บอน นั่นก็เป็นการบ่งชี้อย่างชัดเจนว่า PHA มีคุณสมบัติเป็นพอลิเอสเทอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ (biodegradable polymer) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ตรงกับความต้องการด้านพอลิเมอร์สำหรับอุตสาหกรรมยุคใหม่ (ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, 2552)

คุณสมบัติทางกายภาพของ PHA มีความยืดหยุ่น ทนความร้อน ไม่ละลายน้ำ enantiomeric มีความบริสุทธิ์ ไม่เป็นพิษ สามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) ไม่นำไฟฟ้า (piezoelectric) จุดหลอมเหลวสูง และบางโมโนเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1,000,000 ดาลตัน (Da) ขึ้นไป สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน รวมทั้งทางด้านการแพทย์และเภสัชกร (Steinbüchel และ Hein, 2001)

2.4.1 โครงสร้างของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์อีกตัวหนึ่ง ตรงตำแหน่งบีต้าคาร์บอนจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) แสดงโครงร่างเป็น R-confriguration แต่ละโมโนเมอร์จะเชื่อมต่อกันแบบหัวต่อหาง (head to tail confriguration) เช่นเดียวกับ PP (Brandl และคณะ, 1990) แสดงในรูปที่ 2.4



*C แสดงตำแหน่งบีต้าคาร์บอน

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-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	หรือ P(3HHx)
	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 = เฮกซิล (C_6H_{13})	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต)	หรือ P(3HN)
	R = เฮปทิล (C_7H_{15})	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอต)	หรือ P(3HD)
	R = ออกทิล (C_8H_{17})	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีอันเดคะโอเนต)	หรือ P(3HUD)
	R= โนทิล (C_9H_{19})	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโดเดคะพิโอเนต)	หรือ P(3HDD)
n = 2	R= ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	หรือ P(4HB)
n =3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	หรือ P(3HV)

รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA

(ดัดแปลงจาก Braunegg และคณะ, 2004)

2.4.2 การจัดจำแนกชนิดของ PHA

2.4.2.1 การจัดจำแนกชนิดตามองค์ประกอบทางเคมีของโมโนเมอร์ (Luengo และคณะ, 2003)

2.4.2.1.1 พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันแบบอะโรมาติก

2.4.2.1.2 พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันทั้งแบบอะลิฟาติกและแบบอะโรมาติก

2.4.2.1.3 พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีสารประกอบอื่น เช่น พอลิ-แกมา-กลูตามิก แอซิด (poly-γ-glutamic acid)

2.4.2.2 การจัดจำแนกชนิดตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยโมโนเมอร์ (Lee และคณะ, 1996a; Yim และคณะ, 1996; Hazenberg และ Witholt, 1997; Song และคณะ, 2008)

2.4.2.2.1 short-chain-length (SCL) PHA คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม

2.4.2.2.2 medium-chain-length (MCL) PHA คือพอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม

2.4.2.2.3 long-chain-length (LCL) PHA คือพอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

2.4.2.3 การจัดจำแนกชนิดโดยแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้ (Luengo และคณะ, 2003)

2.4.2.3.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-3-hydroxybutyrate) และพอลิ-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxyvalerate) เป็นต้น

2.4.2.3.2 เฮทเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบดังนี้

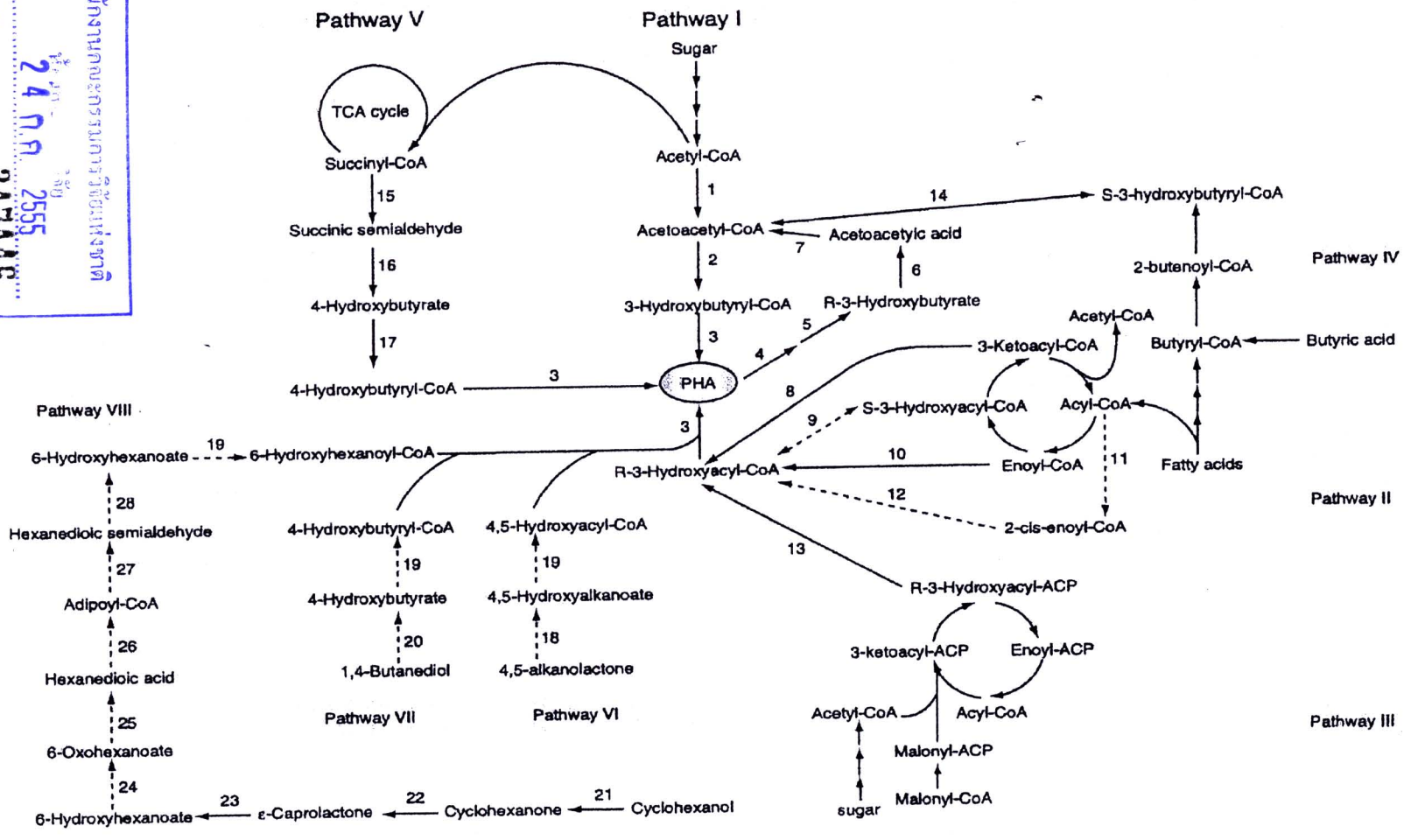
2.4.2.3.2.1 โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [polyhydroxy(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate); PHBV] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate; P(3HB-*co*-4HB)] เป็นต้น

2.4.2.3.2.2 เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate-*co*-4-hydroxybutyrate; P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB)] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตโค-4-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate-*co*-4-hydroxyvalerate; P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HV)]

2.5 วิถีการสังเคราะห์ PHA

วิถีการสังเคราะห์ PHA จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ได้มีการศึกษามาหลายปี พบว่าอะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) เป็นส่วนประกอบสำคัญที่จะทำให้เกิด 3-ไฮดรอกซีแอลคาโนอิลโคเอ (3-hydroxyalkanoyl-CoA) ที่มีความยาวต่างกันขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่จำเพาะในการสังเคราะห์ PHA นอกจากนี้ 3-ไฮดรอกซีแอลคาโนอิลโคเอสามารถเกิดจากกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน (β-oxidation) ของกรดไขมันได้เช่นกัน จากตารางที่ 2.1 มียีนหลายตัวที่แสดงรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA ทั้งทางตรงและทางอ้อม วิถีการสังเคราะห์ PHA สรุปได้เป็น 8 วิถี แสดงในรูปที่ 2.5 และตารางที่ 2.1

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
วันที่ 24 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 217446
เลขเรียกหนังสือ



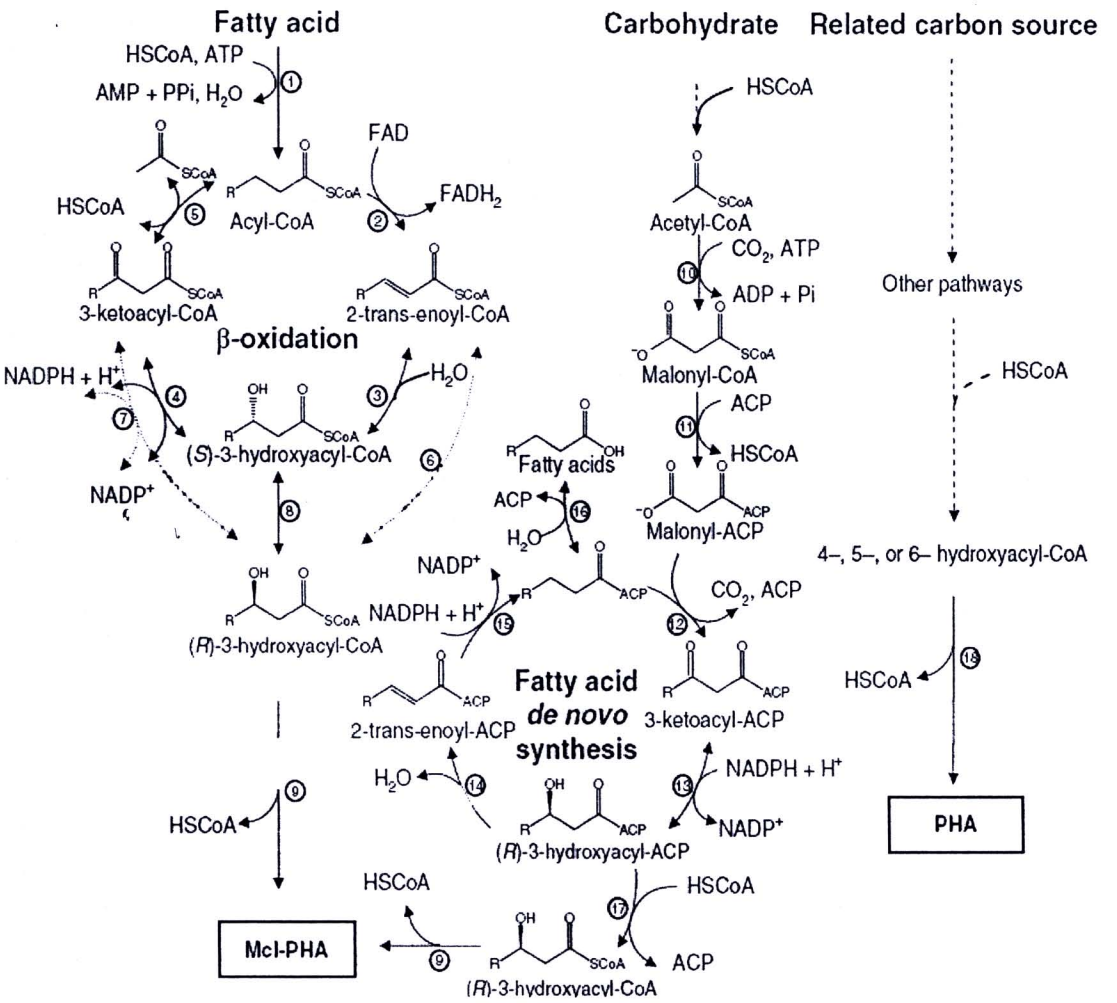
รูปที่ 2.5 วิถีการสังเคราะห์ PHA ตัวเลขแสดงเอนไซม์ (หรือยีน) ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์แสดงในตารางที่ 2.1 (Chen, 2010b)

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA (Chen, 2010b)

ตัวเลข	วิถีการสังเคราะห์	ตัวย่อ	เอนไซม์	สายพันธุ์	อ้างอิง
1	Pathway I	PhaA	β-Ketothiolase	*Ralstonia eutropha*	Sudesh และคณะ (2000)
2		PhaB	NADPH dependent acetoacetyl-CoA reductase		
3		PhaC	PHA synthase		
4	Associated	PhaZ	PHA depolymerase	*Aeromonas hydrophila* 4AK4	Sudesh และคณะ (2000)
5	way		Dimer hydrolase	*Pseudomonas stutzeri* 1317	
6			(*R*)-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase	*R. eutropha*	
7			Acetoacetyl-CoA synthetase	*P. oleovorans*	
8	Pathway II	FabG	3-Ketoacyl-CoA reductase	*P. putida* KT2442,	Sudesh และคณะ (2000)
9			Epimerase	*A. hydrophila* 4AK4,	Mittendorf และคณะ (1998)
10		PhaJ	(*R*)-Enoyl-CoA hydratase/enoyl-CoA hydratase I	*P. aeruginosa*	
11			Acyl-CoA oxidase, putative		
12			Enoyl-CoA hydratase I, putative		
13	Pathway III	PhaG	3-Hydroxyacyl-ACP-CoA transferaseMalonyl-	*P. mendocina*,	Sudesh และคณะ(2000),
		FabD	CoA-ACP transacylase	recombinant *Escherichia*	Zheng และคณะ (2005),
				coli	Taguchi และคณะ (1999)

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA (ต่อ)

ตัวเลข	วิถีการสังเคราะห์	ตัวย่อ	เอนไซม์	สายพันธุ์	อ้างอิง
14	Pathway IV		NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase	*Rhizobium* (Cicer) sp.CC 1192	Chohan และ Copeland
15		SucD	Succinic semialdehyde dehydrogenase	*Clostridium kluyveri*	(1998)
16		4hbD	4-Hydroxybutyrate dehydrogenase		Valentin และ Dennis (1997)
17	Pathway V	OrfZ	4-Hydroxybutyrate-CoA:CoA transferase		
18			Lactonase, putative	Mutants and recombinant of	
19	Pathway VI		Hydroxyacyl-CoA synthase, putative	*Alcaligenes eutrophus*	Valentin และ Steinbüchel
20			Alcohol dehydrogenase, putative	*A. hydrophila 4AK4*	(1995)
21	Pathway VII	ChnA	Cyclohexanol dehydrogenase	*Acinetobacter* sp. SE19,	Xie และ Chen (2008)
22	Pathway VIII	ChnB	Cyclohexanone monooxygenases	*Brevibacterium epidermidis*	Brzostowicz และคณะ
23		ChnC	Caprolactone hydrolase	HCU	(2002)
24		ChnD	6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase		
25		ChnE	6-Oxohexanoate dehydrogenase		
26			Semialdehyde dehydrogenase, putative		
27			6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase, putative		
28			Hydroxyacyl-CoA synthase, putative		



รูปที่ 2.6 กระบวนการเมแทบอลิซึมของการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA 1) acyl-CoA synthetase, 2) acyl-CoA dehydrogenase, 3) enoyl-CoA hydratase, 4) NAD-dependent (S)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, 5) 3-ketoacyl-CoA thiolase, 6) (R)-specific enoyl-CoA hydratase, 7) NADPH-dependent 3-ketoacyl-CoA reducatase, 8) 3-hydroxyacyl-CoA epimerase, 9) mcl-PHA polymerase, 10) acetyl-CoA carboxylase, 11) malonyl-CoA-acyl carrier protein (ACP) transacylase, 12) 3-keto-ACP synthase,13) 3-keto-ACP reductase, 14) 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase, 15) enoyl-ACP reductase, 16) acyl-ACP thiolase, 17) (R)-3-hydroxyacyl-ACP-CoA transacylase, 18) mcl-PHA polymerase (Zinn, 2010)

เนื่องจากงานวิจัยนี้ศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนคือของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วซึ่งมีกรดไขมันเป็นส่วนประกอบ จึงได้เน้นศึกษาถึงกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.6

เบต้าออกซิเดชันเป็นวิถีหลักในการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA เมื่อแบคทีเรียเจริญในอาหารที่มีกรดไขมัน (Kessler และ Witholt, 2001) ในกรณีนี้สารตั้งต้นในการผลิตจะเกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่ได้ ซึ่งหมายความว่า โมโนเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบใน mcl-PHA จะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสารตั้งต้นแต่อาจจะสั้นลงและแตกเป็นสองหน่วย ดังนั้นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่จะผลิต (*R*)-3-hydroxyalkanoates ที่เป็นเลขคู่เท่านั้น ส่วนกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคี่จะผลิต (*R*)-3-hydroxyalkanoates ที่เป็นเลขคี่เท่านั้น (Huijberts และคณะ, 1995) หลังจากที่กรดไขมันเกิดปฏิกิริยาเบต้าออกซิเดชันแล้วจะได้ เอซิลโคเอ (acyl-CoA) เข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ PHA ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีนี้แสดงในรูปที่ 2.6

วิถีกรุชีวสังเคราะห์ที่ 2 จะได้เป็น 3-ไฮดรอกซีแอลคาโนอิลโคเอ จากการสังเคราะห์ด้วยวิถี *de novo* fatty acid ยกตัวอย่างเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นคาร์โบไฮเดรตหรือกลีเซอรอล มีรายงานก่อนหน้านี้กล่าวว่ารูปแบบการสังเคราะห์นี้ไม่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่ได้ Huijberts และคณะ (1992) รายงานว่าโมโนเมอร์ที่พบใน *P. putida* KT2442 ซึ่งเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นได้ PHA ที่มีโมโนเมอร์ที่ไม่อิ่มตัว เช่น (*R*)-3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนอิก แอซิด [(*R*)-3 hydroxydodecenoic acid] และ (*R*)-3-ไฮดรอกซีเตตระเดคีโนอิก แอซิด [(*R*)-3-hydroxytetradecenoic acid]

2.6 แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA

ในปัจจุบันได้มีการผลิต PHA มาใช้แทนพลาสติกที่ผลิตมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเพิ่มมากขึ้น แต่ปัญหาสำคัญที่ตามมาคือ ต้นทุนในการผลิต PHA มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนในการผลิตพลาสติกที่ผลิตมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Lee และคณะ, 1998) โดยพบว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนในการผลิต PHA เป็นต้นทุนของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต PHA ได้จากวัตถุดิบเหล่านี้ซึ่งมีราคาสูง เช่น น้ำตาล น้ำตาลทราย หางนม สไตรีน กรดฟีนิลอะซีติก แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง เป็นต้น (Song และคณะ, 2008) ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.2 ในอนาคตการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมจะเพิ่มขึ้นจึงได้มีการลดต้นทุนในการผลิต PHA โดยนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ นำกลับมาใช้ใหม่เพื่อเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA (Braunegg และคณะ, 2004)

ดังนั้นจึงเป็นมูลเหตุจูงใจในการทำวิจัยครั้งนี้ โดยการนำของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซลซึ่งผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว โดยในของเสียนี้จะประกอบไปด้วยกลีเซอรอลและสารเคมีชนิดอื่นๆ เจือปนอยู่จำนวนมาก เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจของ

ของเสียนี้โดยการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ต่อไป เป็นการลดต้นทุนในการผลิต PHA และลดปริมาณขยะอินทรีย์ที่จะถูกกำจัดทิ้งโดยไม่เกิดประโยชน์

ตารางที่ 2.2 วัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA (Braunegg และคณะ, 2004)

คาร์โบไฮเดรต	กากน้ำตาล (Molasses) แป้ง และแป้งที่ผ่านการแตกตัวได้เป็นน้ำตาลมอลโตส (Maltose) น้ำตาลแลคโตสจากหางนม (Lactose from whey) เซลลูโลสที่ผ่านการแตกตัวแล้ว (เช่น เส้นใยที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษหลังจากผ่านการไฮโดรไลซิสและใช้การแลกเปลี่ยนไอออนเพื่อดึงเอาโลหะหนักออก)
แอลกอฮอล์	ของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยมีเมทานอลและกลีเซอรอลผสมอยู่
ไขมันและน้ำมัน	ของเหลือทิ้งจากพืชและสัตว์
กรดอินทรีย์	กรดแลคติคจากอุตสาหกรรมนม

ทุกวันนี้นักวิจัยหันมาสนใจเทคโนโลยีในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกหรือเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ มาเป็นวัตถุดิบดังแสดงในตารางที่ 2.3 เพื่อลดต้นทุนการผลิต ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

จากตารางที่ 2.4 แสดงแหล่งคาร์บอนที่มีกรดไขมันมันเป็นองค์ประกอบ พบว่า PHA ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะเป็น mcl-PHAs ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนและแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต PHA

ตารางที่ 2.3 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHAs โมโนเมอร์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	PHAs (g/L)	ปริมาณPHAs (wt %)	อ้างอิง
Hydrolyzed corn oil	*Pseudomonas putida*	mcl-PHAs	103	28	27.2	Shang และคณะ, 2008
Whey	*P. hydrogenovora*	PHB	5	1.27		Koller และคณะ, 2008
Sugar cane molasses	Mixed bacteria	PHBV			30	Albuquerque และคณะ, 2007
Soy molasses	*P. corrugate*	P(HDD-HO-HTDE)	3.6		5-17	Solaiman และคณะ, 2006
Enzymatic extruded starch	*Haloferax mediterranei*	PHBV	39.4	20	50.8	Chen และคณะ, 2006
Petrochemical plastic waste	*P. putida* CA-3		1.14	0.84	43	Goff และคณะ, 2007
Paper mill wastewater	Activated sludge	PHBV			48.2	Bengtsson และคณะ, 2008
Bagasse hydrolysates	*Ralstonia eutropha*	PHB	11.1±0.4		56.5±0.5	Yu และคณะ, 2008
Waste tomato starch	*R. eutropha* NCIMB 11599	PHB	179	94	55	Haas และคณะ, 2008
Crude glycerol	*Cupriavidus necator* JMP 134	PHB	50		48	Mothes และคณะ, 2007

ตารางที่ 2.3 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHAs โมโนเมอร์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	PHAs (g/L)	ปริมาณPHAs (wt %)	อ้างอิง
Palm kernel oil	*C. necator* PHB-4	P(HB-HV-HHx)	7.9		79	Bhubalan และคณะ, 2008
Plant oils	*C. necator* H16	PHBV	4.4-5.6	6.8	80	Lee และคณะ, 2008
Wheat bran	*P. aeruginosa* MTCC 7925	P(3HB-*co*-3HV-*co*-3HHD-*co*-3HOD)	0.168		12.5	Singh และ Mallick, 2009

ตารางที่ 2.4 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีกรดไขมันผสมอยู่

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHAs โมโนเมอร์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	ปริมาณPHAs (wt %)	อ้างอิง
Waste vegetable oil	*Pseudomonas* sp.strain DR2	mcl-PHAs	0.54	23.52	Song และคณะ, 2008
Saponified vernonia galamensis oil	*Alcaligenes eutrophus* strain17699	PHB	0.27	42.8	Ayorinde และคณะ, 1998
Reused oil	*P. aeruginosa*	mcl-PHAs	5.41±0.05	5.72±1.0	Chan และคณะ, 2006
Biodiesel Co-production stream	*P. corrugata* 388	mcl-PHAs	2.1	42	Ashby และคณะ, 2004
Waste glycerol	*Cupriavidus necator* DSM 545	PHB	38.1	50	Cavalheiro และคณะ, 2009
Glycerol	*Zobellella denitrificans* strain MW1	PHB	5	87	Ibrahim และ Steinbüchel, 2009
Soybean oil	*P. stutzeri* 1317	3HO,3HD,3HDD	2.7	63	He และคณะ, 1998
Plam kernel oils และ sodium valerate	*C. necator* H16	P(3HB-*co*-3HV)	7.5	90	Lee และคณะ, 2008
Oil wastes	*Staphylococcus epidermidis*	PHB	2.5	15.02	Wong และคณะ, 2000
Linseed oil	*P. putida* strain KT2442	LC-PHAs	3	20	Casini และคณะ, 1997
Plam oil	*Wautersia eutropha* H16 PHB^{-}4	P(3HB-*co*-3HHx)	4.3	87±2	Loo และคณะ, 2005

ตารางที่ 2.4 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีกรดไขมันผสมอยู่ (ต่อ)

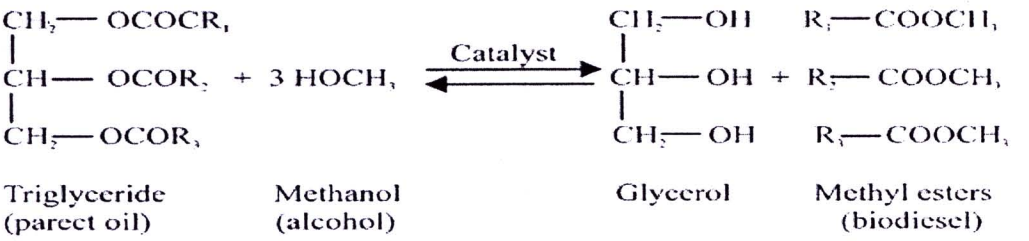
แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHAs โมโนเมอร์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	ปริมาณPHAs (wt %)	อ้างอิง
Coprah oil	*P. guezennei* biovar. *tikehau*	P(HO-HD-HDD)		63	Simon-Colin และคณะ, 2008
Waste cooking oil	*P. aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044)	mcl-PHAs	7.6	36	Haba และคณะ, 2007
Mustard oil	*P. aeruginosa* MTCC 7925	P(3HB-*co*-3HV-*co*-3HHD-*co*-3HOD)	1.58	27.3	Singh และ Mallick, 2009

2.7 ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Waste from biodiesel production process)

ปัจจุบันยุโรปมีการออกกฎหมายใหม่ให้มีการใช้ biofuel เพิ่มขึ้นในตลาด 5.75% ในช่วงเดือนธันวาคม ปี 2010 (Bozbas, 2008; Vasudevan และ Briggs, 2008) ทำให้มีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ร่วมปริมาณมากชนิดหนึ่งคือ กลีเซอรอล โดยจะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิต PHA ได้ โดยพบว่าในการผลิตไบโอดีเซล 1 กิโลกรัมจะทำให้เกิดกลีเซอรอล 100 กรัม ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงหลักที่นำมาใช้แล้วไม่ก่อผลเสียให้กับระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตและพบว่าไบโอดีเซลมีคุณภาพในการปล่อยพลังงานได้ดีกว่าน้ำมันดีเซลที่มาจากอุตสาหกรรม ปิโตรเคมีโดยขึ้นอยู่กับการนำไปใช้ (Koller และคณะ, 2010)

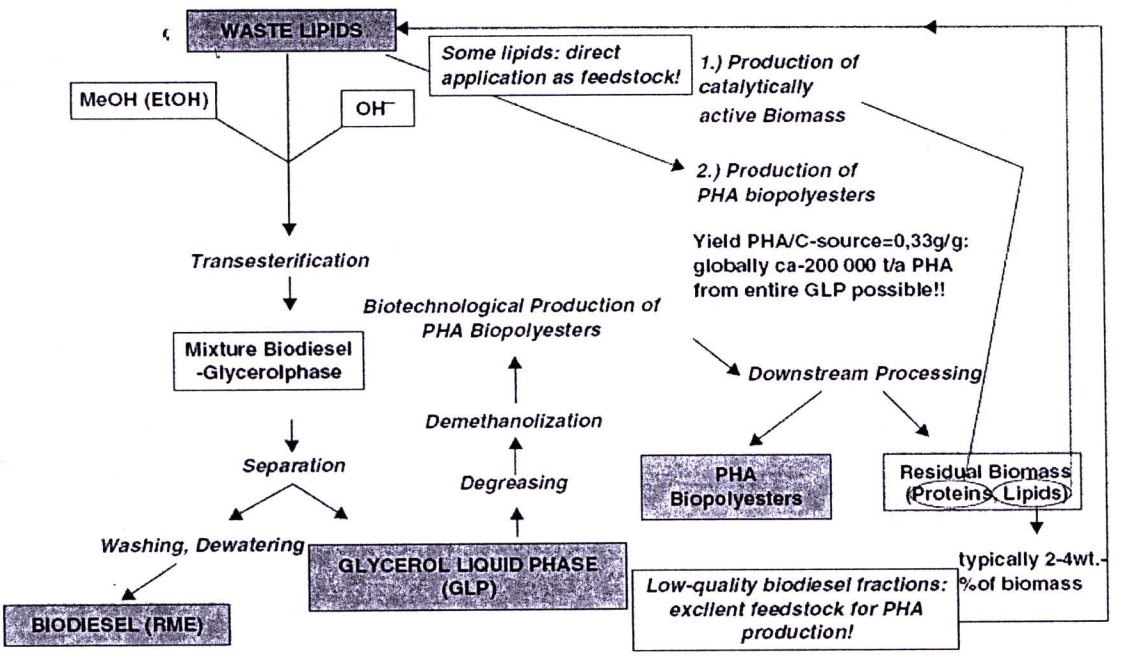
ไบโอดีเซลผลิตมาจากแหล่งไขมันที่แตกต่างกัน เช่น น้ำมันเมล็ดเรพ น้ำมันปาล์ม เป็นต้น ในปัจจุบันการนำน้ำมันพืชที่ใช้ประกอบอาหารมาผลิตไบโอดีเซลถือว่าไม่เหมาะสมและทำให้ไม่ได้รับการยอมรับ ดังนั้นจึงนำน้ำมันที่ใช้แล้วจากร้านอาหารและ soapstocks ซึ่งเป็นการลดราคาวัตถุดิบที่ดีมากในการผลิต PHA (Vasudevan และ Briggs, 2008)

รูปที่ 2.7 แสดงปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ โดยใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี (catalyst) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ หรือที่เรียกว่า น้ำมันไบโอดีเซล และกลีเซอรอล โดยแอลกอฮอล์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ เมทานอล หรือเอทานอล ซึ่งเอสเทอร์ที่ได้นั้นอาจเป็นเมทิลเอสเทอร์ หรือเอทิลเอสเทอร์ ตามชนิดแอลกอฮอล์ที่เลือกใช้ และได้กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมปริมาณมากแสดงในรูปที่ 2.8 (ณัฐกานต์ บุศรพงษ์พานิช และ ณรงค์ฤทธิ์ คงอยู่, 2548) หากน้ำมันพืชที่นำมาใช้ผลิตเป็นไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้ว จะทำให้คุณภาพของกลีเซอรอลต่ำเนื่องจากมีปริมาณสิ่งเจือปนสูง ยากต่อการทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป และเป็นปัญหาในระบบบำบัดน้ำเสีย



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ที่มา : http://econuz.com/page/7/ (Accessed 11 August 2010)



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล และการนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้มาใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA รวมทั้งการนำของเสียที่เป็นไขมันมาผลิต PHA โดยตรง (Koller และคณะ, 2010)

จากการที่น้ำมันจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีนั้นมีราคาสูงเพิ่มขึ้นต่อเนื่อง ทำให้มีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นด้วยในหลายพื้นที่ทั่วโลก ส่งผลให้ราคาของกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้ลดลงด้วย ในปี 2008 Canakci และ Sanli รายงานว่าในปี 2006 ทั่วยุโรปมีการผลิตไบโอดีเซล 4.6×10^6 ตันซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิม 77 เปอร์เซ็นต์ ในสหรัฐอเมริกามีการผลิต 7.5×10^5 ตัน ในประเทศออสเตรียมีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มมากขึ้นจาก 121,665 ไปถึง 241,381 ตัน ตั้งแต่ปี

2006 ถึง 2007 ซึ่งเพิ่มถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดกลีเซอรอล 24,000 ตัน การนำกลีเซอรอลมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกชีวภาพนอกจากเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจแล้ว ยังเป็นการลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

Cavalheiro และคณะ (2009) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Cupriavidus necator* DSM 545 โดยใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลและกลีเซอรอลที่ใช้ทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบเฟดแบตช์ (fed-batch) เปรียบเทียบกัน พบว่ากลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 51.2 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB 62 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการกลีเซอรอลที่ใช้ทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอนมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 38.1 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

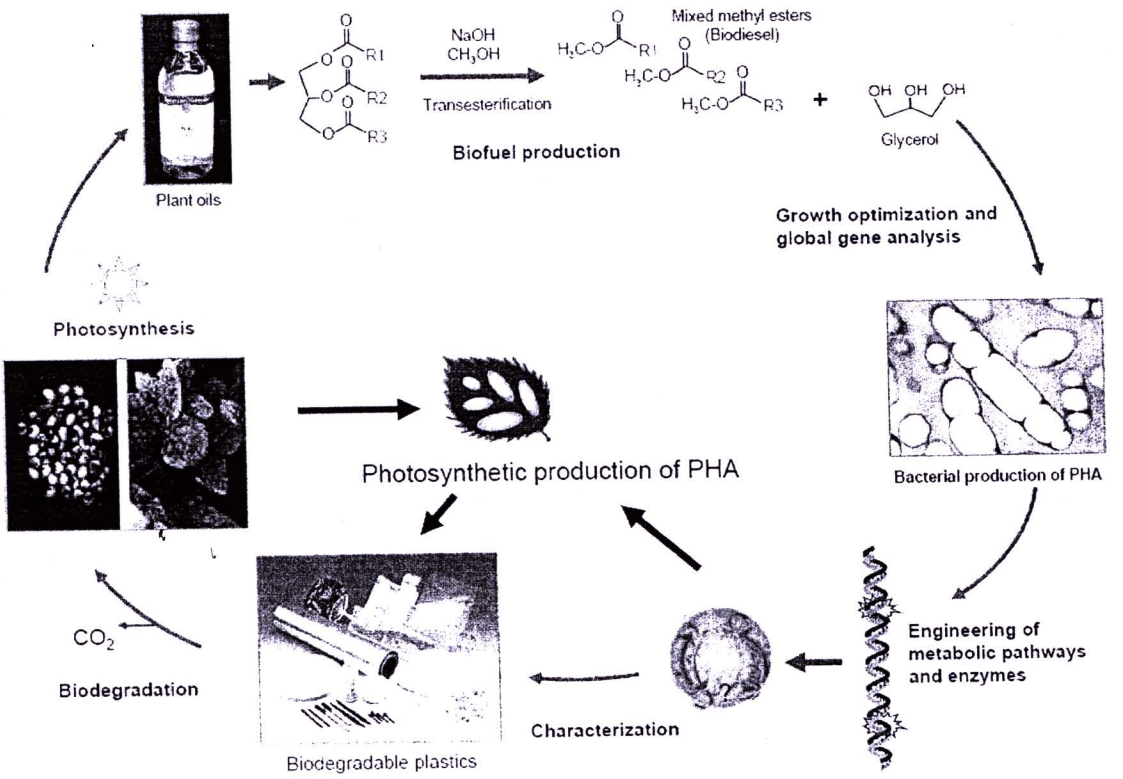
Ibrahim และ Steinbüchel (2009) คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHA จากแหล่งน้ำ น้ำเสีย และดิน ในประเทศเยอรมันและอียิปต์ พบว่า *Zobellella denitrificans* สายพันธุ์ MW1 สามารถผลิต PHA ได้ทดสอบเบื้องต้นโดยการย้อมแกรนูลด้วย Nile Blue A นำกลีเซอรอลมาเป็นแหล่งคาร์บอน มีการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต 41 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรด ด่างเท่ากับ 7.3 พบว่ามีการผลิต PHB 80.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัมต่อลิตร ทำให้มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น 5 กรัมต่อลิตร มีปริมาณ PHB 87 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้พบว่า *Z. denitrificans* สายพันธุ์ MW1 สามารถผลิต P(3HB-co-3HV) ได้เมื่อใช้โพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับกลีเซอรอลด้วย

Song และคณะ (2008) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการนำน้ำมันพืชไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยคัดเลือกจากดินในทุ่งข้าวของประเทศเกาหลีโดยใช้น้ำมันข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในการคัดเลือก พบทั้งหมด 4 สายพันธุ์ที่สามารถนำน้ำมันพืชไปใช้ได้ ได้แก่ *Enterobacteriaceae* sp. CR1, *Rhodococcus* sp. CR2, *Acinetobacter* sp. DR1 และ *Pseudomonas* sp. DR2 เมื่อนำไปผลิต PHA โดยใช้น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันที่ใช้แล้วมาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Acinetobacter* sp. DR1 และ *Pseudomonas* sp. DR2 สามารถผลิต mcl-PHA ได้ ทำการทดสอบเบื้องต้นด้วยการย้อมด้วย Nile Blue A แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ พบว่า *Pseudomonas* sp. DR2 แสดงจุดสีส้มจำนวนมากซึ่งมากกว่า *Acinetobacter* sp. DR1 Song และคณะจึงได้ศึกษาการผลิต mcl-PHAs ต่อโดยใช้ *Pseudomonas* sp. DR2 พบว่าเมื่อใช้น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันที่ใช้แล้วมาเป็นแหล่งคาร์บอนได้ PHA เท่ากับ 37.34 เปอร์เซ็นต์ และ 37.52 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ [mcl-

PHAs ที่ได้ประกอบด้วยโมโนเมอร์หลักคือ 3HO (39.63 เปอร์เซ็นต์, 3-hydroxyoctanoate), 3HD (34.13 เปอร์เซ็นต์, 3-hydroxydecanoate) และ 3HDD (11.37 เปอร์เซ็นต์,3-hydroxydodecanoate) ส่วนโมโนเมอร์ย่อยอื่นๆ น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์]

2.8 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนการสังเคราะห์ PHA โดยการใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHA จากของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลแสดงในรูปที่ 2.9 เป็นการนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผสิตไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยในกลีเซอรอลนั้นอาจมีสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ และเมทานอลเจือปนจำนวนมากมาเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ซึ่งจะสร้างและสะสมแกรนูลของ PHA ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ จากนั้นสกัด PHA และทำให้บริสุทธิ์ นำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชนิดต่างๆ หลังจากผ่านการใช้งานแล้ว PHA อาจถูกกำจัดเช่นเดียวกับขยะประเภทของแข็งทั่วไป เมื่อเกิดการย่อยสลายโดยธรรมชาติจะได้เป็นปุ๋ยที่มีแหล่งอินทรีย์คาร์บอนที่สมบูรณ์ ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำ รักษาปริมาณสารอาหารในดิน เมื่อย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และนำกลับมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิต PHA ต่อไป (Gerngross, 1999; Dove, 2000; Stevens, 2002; Kim และ Dale, 2005)



รูปที่ 2.9 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนการสังเคราะห์ PHA โดยการใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

ที่มา: http://www.bio.org/ind/wc/08/breakout_pdfs (Accessed 10 August 2010)

2.9 การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

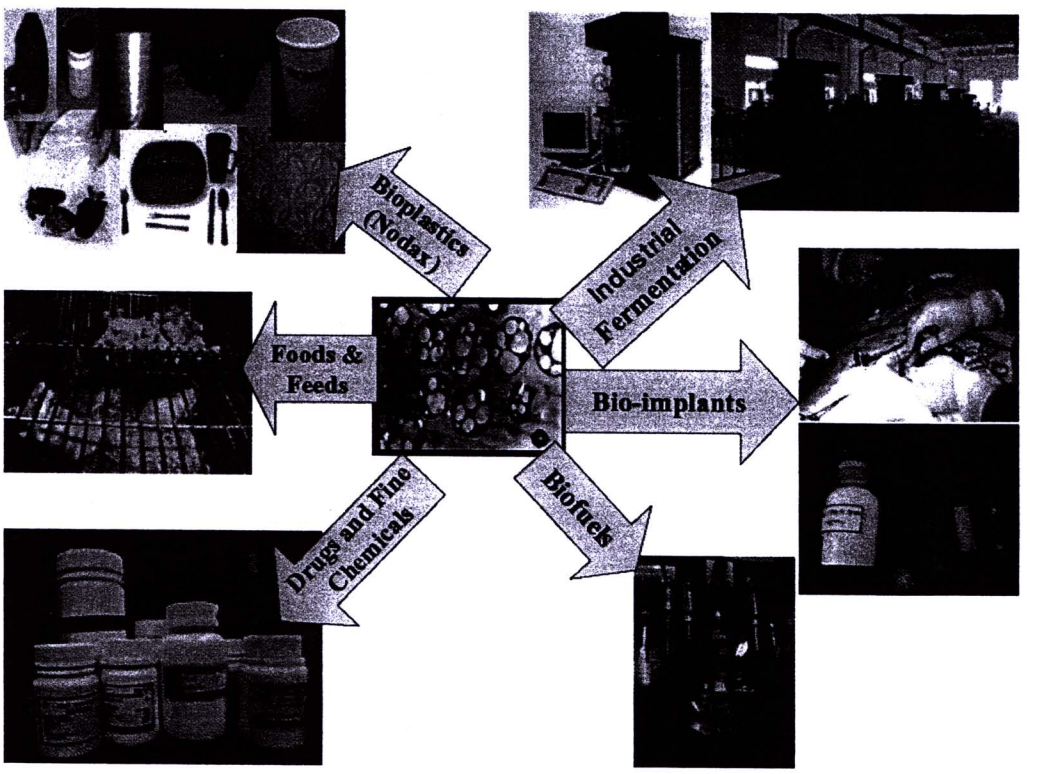
PHA ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมผลิตเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้และ/หรือสามารถผสมเข้ากับพลาสติกเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านอื่นๆ อีกมากมาย (Lee, 1996a) ดังแสดงในรูปที่ 10 PHB ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 100-200 หน่วย ซึ่งพบว่ามีองค์ประกอบคล้ายกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต Reusch และคณะ (1992) ได้พบองค์ประกอบที่คล้ายกับ PHB จำนวนมากในพลาสมาของเลือดมนุษย์ (blood plasma) ดั่งนั้นมีความน่าจะเป็นไปได้สูงที่จะนำ PHB ไปใช้กับเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยไม่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ด้วยคุณสมบัติที่ PHA มีสมบัติการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นวัสดุปลูกถ่ายที่มีสมบัติการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดกลไกการต่อต้านระหว่างวัสดุปลูกถ่ายและเซลล์เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต

ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติเด่นของ PHA ที่นำไปสู่ในการประดิษฐ์วัสดุทางการแพทย์ ตัวอย่างความเป็นไปได้ที่จะนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ

- บรรจุภัณฑ์ทางอุตสาหกรรม เช่น ฟิล์มห่อหุ้มวัสดุ กระเป๋าและถุงบรรจุภัณฑ์ บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในยารักษาโรค ยาฆ่าแมลง ยากำจัดวัชพืช หรือปุ๋ย (Brandl และคณะ, 1990)
- ผลิตภัณฑ์ที่ออกแบบมาให้ใช้แล้วทิ้ง เช่น ใบมีดโกน เครื่องใช้ในบ้านบางชนิด ผ้าอ้อม หรือผลิตภัณฑ์ที่ใช้ดูแลทำความสะอาดสำหรับผู้หญิง (Lee, 1995)
- อุตสาหกรรมเคมี เป็นวัตถุดิบในการผลิตองค์ประกอบไครัล (chiral compound) (Chen และ Wu, 2005)
- วัสดุที่ใช้ทางการแพทย์ เช่น วัสดุตกแต่งบาดแผล เข็มที่ใช้ในการเย็บแผล ผ้าก๊อซหรือสำลีที่ใช้ในการทำความสะอาดบาดแผล (Lee, 1995)
- วัสดุค้ำจุนและช่วยการผสานกระดูกในทางการแพทย์ออธอพีดิกซ์ กระตุ้นการเจริญของกระดูกและสมานกระดูก (Brandl และคณะ, 1990)
- ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารเพื่อสุขภาพ (Chen, 2009)
- อุตสาหกรรมทอผ้า โดย PHA สามารถนำไปผ่านกระบวนการผลิตเป็นไฟเบอร์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอเช่นเดียวกับไนลอน (Chen, 2009)
- อุตสาหกรรมยา เฉพาะ PHB ที่มีโครงสร้างเป็น R-configuration มีคุณสมบัติรักษาโรคอัลไซเมอร์ และโรคพากินสัน (Alzheimer's และ Parkinson's diseases) (Kashiwaya และคณะ, 2000) โรคข้อกระดูกอักเสบ (Massieu และคณะ, 2003) ช่วยปรับปรุงและฟื้นฟูความจำ (Zou และคณะ, 2009)
- ใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีน (Protein purification) โดยให้แกรนูลของ PHA จับกับ phasin proteins (PHA granule binding protein phasin; PhaP) ทำให้ recombinant proteins บริสุทธิ์ (Wang และคณะ, 2008)

ในปัจจุบันประเทศที่มีเทคโนโลยีด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจะเป็นผู้นำในการกำหนดทิศทางการใช้สินค้าจากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และพัฒนารูปแบบไปสู่กฎหมายหรือแผนปฏิบัติการระหว่างประเทศที่ทำให้เกิดอำนาจต่อรองด้านธุรกิจการค้าในเวทีโลก เราจึงเห็นได้ว่าความตื่นตัวด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพทั้งด้านนโยบาย การวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรม และการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อเร่งรัดให้เกิดการทดแทนพลาสติกทั่วไปนั้นเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีขั้นตอนที่มีทิศทางอย่างชัดเจน เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นหนึ่งในประเทศ

ผู้นำด้านวิทยาการและเทคโนโลยีพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยประสบความสำเร็จในการผลิตเม็ดพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม เช่น บริษัท NatureWorks LLC ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติกและ PLA โดยมีชื่อทางการค้าว่า Ingeo™ ในขณะที่บริษัท Telles ประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถผลิต PHAs โดยมีชื่อทางการค้าว่า Mirel™ ในปี 2009 มีการผลิต PHAs 50,000 ตัน โดยกำหนดราคาขายในราคากิโลกรัมละ €1.50 (Chanprateep, 2010)



รูปที่ 2.10 การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ (Chen, 2010b)

ในปัจจุบันมีหลายบริษัททั่วโลกได้พัฒนาการผลิต PHA ดังแสดงในตารางที่ 2.5 บริษัท ZENECA Bio-Products หรือบริษัท Imperial Chemical Industries (ICI plc) เป็นบริษัทแรกที่ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Cupriavidus nacator* (โดยชื่อเดิมคือ *Ralstonia eutropha* หรือ *Alcaligenes eutrophus*) (Vandamme และ Coenye, 2004; Vaneechoutte และคณะ, 2004) ในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-*co*-3HV) และ PHB มีชื่อทางการค้าว่า BIOPOL ในปี 1990 มีการผลิต 1,000 ตันต่อปีและมีการตั้งเป้าหมายไว้ว่าในปี 2008 มีการผลิตถึง 50,000 ตันต่อปี (Verlinden และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีหลายบริษัทที่ผลิต PHB เช่น Mitsubishi Gas Chemical Company

Inc. ประเทศญี่ปุ่น มีชื่อทางการค้าว่า Biogreen® PHB Industrial Company ประเทศบราซิล มีชื่อทางการค้าว่า Biocycle® Biomer Inc. ประเทศเยอรมนี มีชื่อทางการค้าว่า Biomer® บริษัทที่ผลิต P(3HB-*co*-3HV) เช่น บริษัท Tianan Biologic, Ningbo ประเทศจีน มีชื่อทางการค้าว่า Enmat® เป็นต้น ปัจจุบันมีหลายประเทศที่รณรงค์และออกกฎหมายเกี่ยวกับการใช้ถุงพลาสติก เช่น ในประเทศไอร์แลนด์ สก็อตแลนด์ เดนมาร์ก และสวีเดนมีการจัดเก็บภาษีการใช้ถุงพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ ในประเทศบังคลาเทศมีการต่อต้านการใช้ถุงพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้เริ่มต้นเมื่อเดือนมกราคม ปี 2002 ในประเทศอิตาลีมีการเก็บเงินเพิ่ม €0.10–0.20 เมื่อซื้อของโดยใส่ถุงพลาสติกเมื่อปี 2009 เป็นต้น (Chanprateep, 2010)

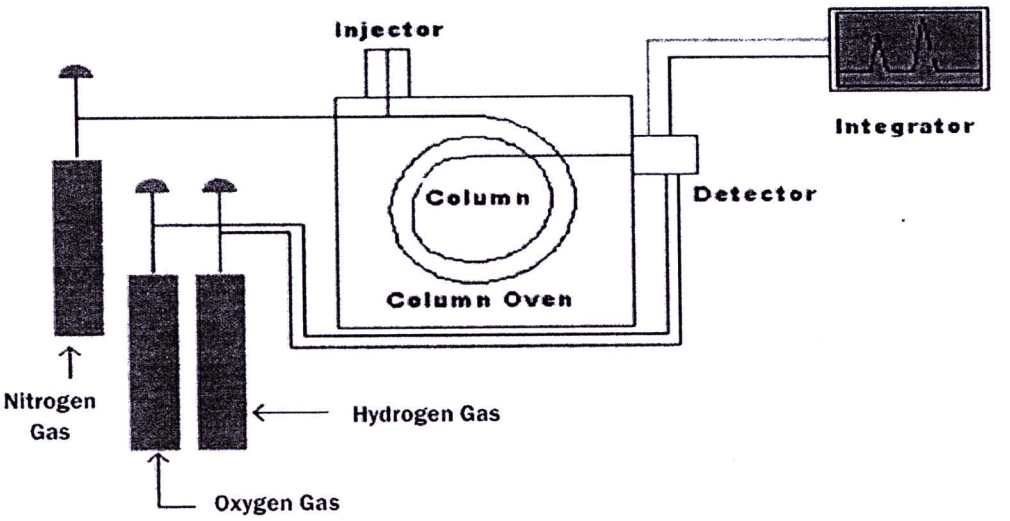
ตารางที่ 2.5 บริษัทที่มีการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม (Lee, 1996a; Reddy และคณะ, 2003; Chen, 2010a)

จุลินทรีย์ / วัตถุดิบ	บริษัท
Alcaligenes eutrophus (H16)	- ZENECA Bio-Products ชื่อเดิม ICI Ltd.(อังกฤษ)
	- Tianjin Northern Food (จีน)
A. latus	- Biotechnolgische Forschungs gesellschaft mbH (ออสเตรีย)
	- Petrochemia Danubia
Aeromonas hydrophila	- Procter & Gamble (สหรัฐอเมริกา)
Bhurkolderia sp.	- PHB Industrial Usina da Pedra-Acucare Alcool (บราซิล)
พืชตัดแต่งพันธุกรรม	- Metabolix Inc. (สหรัฐอเมริกา)
พืชตัดแต่งพันธุกรรม (เมล็ดเรพ,ถั่วเหลือง)	- Monsanto (สหรัฐอเมริกา)
พืชตัดแต่งพันธุกรรม (เมล็ดเรพ)	- ZENECA Seeds (อังกฤษ)
Escherichia coli ตัดแต่งพันธุกรรม	- Bio Ventures Alberta Inc. (แคนนาดา)
	- Lantian Group (จีน)
แป้ง	- Warner_s Lambert (สหรัฐอเมริกา)
	- Fertec (Ferruzi e Technologia) (อิตาลี)
	- Biotec(Melitta) Emmerich (เยอรมนี)
	- BASF Ludwigshafen (เยอรมนี)
	- Bayer/Wolf Walsrode Leverkusen (เยอรมนี)
	- Novamont Novara (อิตาลี)
เฮมิเซลลูโลส	- Polyferm Inc. (แคนนาดา)
แบคทีเรียชนิดอื่นๆ	- Biocorp (สหรัฐอเมริกา)
	- Asahi Chemicals and Institute of Physical and Chemical Research (ญี่ปุ่น)

2.10 การวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของ PHA

2.10.1 ก๊าซโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography: GC) (รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์, 2549)

เป็นเทคนิคสำหรับแยกสารตัวอย่างที่เป็นสารผสม โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง แล้วให้ไอของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือก๊าซตัวพา องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากกัน โดยองค์ประกอบภายในเครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟี แสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 องค์ประกอบของเครื่อง Gas chromatography
ที่มา:http://classes.engr.oregonstate.edu/cbee/spring2005/che415/PublicTeam1/Biodiesel_Project_Proposal.html (Accessed 15 August 2010)

ในการวิเคราะห์สารผสม ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าที่ช่องฉีดตัวอย่าง (injection port) สารผสมจะถูกให้ความร้อนจนกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารผสมจะแยกออกจากกันเมื่อเคลื่อนผ่านคอลัมน์และถูกตรวจวัดโดยดีเทคเตอร์ สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จากดีเทคเตอร์จะถูกบันทึกและแสดงออกมาในรูปของโครมาโตรแกรม

เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

ก๊าซตัวพาที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่นั้นต้องเป็นก๊าซเฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยา ได้แก่ ไนโตรเจน ฮีเลียม อาร์กอน และคาร์บอนไดออกไซด์ การเลือกชนิดของก๊าซจะขึ้นอยู่กับชนิดของดีเทคเตอร์ที่ใช้

Sample Injection System อุณหภูมิของ Injector จะสูงกว่าใน oven ประมาณ 50 องศาเซลเซียส สารตัวอย่างจะถูกทำให้เป็นไอและส่งผ่านสู่ chamber ปริมาณสารที่ฉีดเข้าสู่ระบบ ~1 ไมโครลิตร คอลัมน์ที่ใช้เป็นแคพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) เส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ประกอบด้วย wall coated open tubular จะเคลือบผนังภายในด้วยเฟสของเหลวคงที่ (liquid stationary phase) และสารเคลือบค้ำจุน (support coated tubular) เคลือบผนังภายในด้วยเฟสของแข็งคงที่ (solid stationary phase) ประสิทธิภาพของคอลัมน์สองชนิดนี้ดีกว่าคอลัมน์แบบแพ็ค (packed column)

Oven จะเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ เพื่อให้ได้งานที่มีความแม่นยำ การควบคุมอุณหภูมิจะต้องมีความละเอียดถึง 0.1 องศาเซลเซียส การตั้งค่าอุณหภูมินั้นจะขึ้นอยู่กับจุดเดือดของตัวอย่าง โดยปกติแล้วอุณหภูมิคอลัมน์จะถูกตั้งไว้สูงกว่าจุดเดือดของตัวอย่าง ขณะที่ตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่อุณหภูมิต่ำจะให้ค่าความละเอียดของการวัดสูง แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น ถ้าสารประกอบแต่ละชนิดในตัวอย่างมีจุดเดือดใกล้เคียงกัน จะตั้งค่าอุณหภูมิเพียงค่าเดียว (isothermal) ถ้าสารประกอบแต่ละชนิดในตัวอย่างมีจุดเดือดช่วงกว้าง จะใช้โปรแกรมอุณหภูมิในการแยกสาร คือ อุณหภูมิของคอลัมน์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งการแยกเสร็จสิ้น ส่วน detector และ recorder ที่ใช้เป็นแบบไม่จำเพาะเพื่อให้ใช้งานได้หลากหลาย

เมื่อสารถูกแยกและทำการวิเคราะห์แล้ว หน่วยประมวลผลจะแสดงผลการวิเคราะห์ออกมาในรูปโครมาโตรแกรมซึ่งจะแสดงเปอร์เซ็นต์ abundance และเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (retention time) เครื่องสามารถวิเคราะห์หาความสูงของพีคและพื้นที่ใต้พีคเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารได้อีกด้วย การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis) ด้วยวิธีสารมาตรฐานภายในเป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณของสารได้ถูกต้องที่สุด แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารมาตรฐานภายในต้องมีคุณสมบัติดังนี้ สารนั้นต้องมีคุณสมบัติคล้ายสารที่จะวิเคราะห์ ต้องถูกชะออกจากคอลัมน์หมด ต้องให้พีคที่แยกอยู่ต่างหาก โดยพีคจะไม่ซ้ำหรือเหลื่อมทับพีคอื่นๆ และอยู่ใกล้พีคที่ต้องการหา และสารนั้นต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

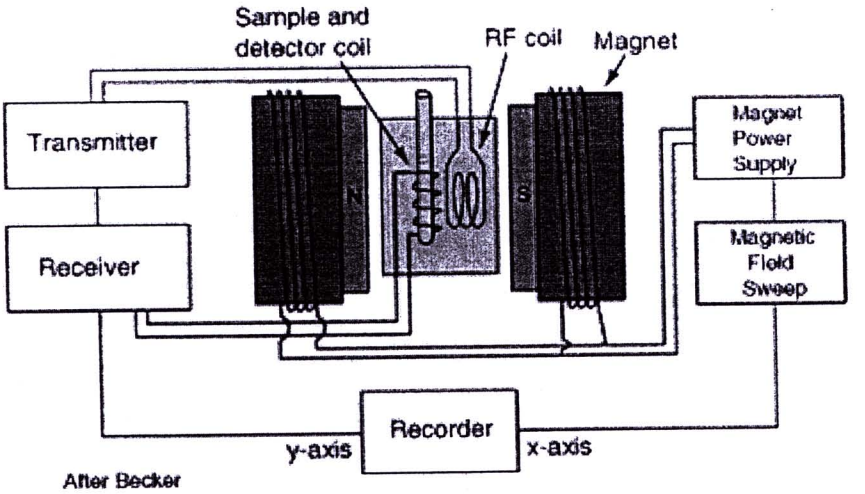
2.10.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy: NMR) (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2539)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี หรือที่เรียกโดยย่อว่า เอ็นเอ็มอาร์ (NMR) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก มีประโยชน์มากในการศึกษาเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ได้ด้วย แสดงองค์ประกอบของเครื่อง NMR ในรูปที่ 2.12

หลักการของ NMR นิวเคลียสเป็นอนุภาคที่มีประจุ ในนิวเคลียสของธาตุบางชนิดประจุนี้จะหมุนหรือสปิน (spin) เป็นวงรอบแกนนิวเคลียส (nuclear axis) (Field และ Sternhell, 1989) การสปินของนิวเคลียสนี้จะก่อให้เกิดโมเมนต์แม่เหล็ก (magnetic moment) เมื่อสนามแม่เหล็กภายนอกกระทำกับนิวเคลียส จะไปทำให้นิวเคลียสที่จำเพาะเจาะจงเกิดการหันไปในทิศทางที่แน่นอนเมื่อเทียบกับทิศทางของสนามแม่เหล็ก ทิศทางการจัดตัวที่ต่างกันจะมีค่าพลังงานที่ต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถนำข้อมูลค่าพลังงานที่วัดได้มาบ่งบอกถึงทิศทางการจัดตัวของนิวเคลียสชนิดต่างๆ ได้ ในการวัดสัญญาณ NMR จะต้องนำตัวอย่างที่ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม (ซึ่งจะต้องปราศจากนิวเคลียสชนิดเดียวกับที่กำลังจะตรวจวัดสัญญาณ NMR ตัวอย่างเช่นหากจะวัดสัญญาณของโปรตอนในสารตัวอย่างตัวทำละลายจะต้องไม่มีโปรตอน เช่น CCl_4 หรือต้องเป็นตัวทำละลายที่มีดิวทีเรียมแทน เช่น $CDCl_3$) อยู่ในหลอดแก้วยาว ไปวางไว้ในสนามแม่เหล็กที่มีความแรงมาก ซึ่งในยุคแรกๆ จะใช้แม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งสามารถเพิ่มความแรงได้อย่างจำกัด ในปัจจุบันจะนิยมใช้แม่เหล็กแบบซูเปอร์คอนดักเตอร์ ซึ่งจะต้องหล่อเย็นด้วยฮีเลียมเหลวตลอดเวลาจึงจะทำงานได้ แม่เหล็กแบบนี้จะสร้างสนามแม่เหล็กที่เข้มกว่าแบบแม่เหล็กไฟฟ้าปกติมาก และความแรงสนามแม่เหล็กนี้เองที่เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของเครื่อง NMR โดยมักจะเปรียบเทียบด้วยตัวเลขสัญญาณความถี่ของโปรตอน เช่น เครื่อง 500 MHz, 200 MHz หรือ 60 MHz โดยถ้ายิ่งตัวเลขมาก ก็แสดงว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าทั้งในแง่ของความไว (sensitivity) และความละเอียดของการวัด (resolution) อย่างไรก็ตามราคาของเครื่องและค่าใช้จ่ายการดูแลรักษาก็จะสูงตามไปด้วย เครื่องที่ใช้กันในห้องปฏิบัติการวิจัยทั่วไปปัจจุบันจะทำงานที่ความถี่ 200-500 MHz

ส่วนประกอบสำคัญอีกส่วนหนึ่งนอกจากแม่เหล็กก็คือตัวส่ง (radiofrequency generator) และตัวรับสัญญาณคลื่นวิทยุ (detector and amplifier) ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งสัญญาณคลื่นวิทยุไปยังตัวอย่างและตรวจวัดสัญญาณที่ถูกดูดกลืน หรือปลดปล่อยออกมา ในยุคแรกการ

วัดสัญญาณ NMR จะทำในลักษณะที่เรียกว่าคลื่นต่อเนื่อง (continuous wave; CW) โดยเครื่องส่งสัญญาณคลื่นวิทยุจะต้องแปรความถี่ของคลื่นวิทยุที่ส่งผ่านเข้าไปในตัวอย่างไปเรื่อยๆ และตรวจวัดสัญญาณหลังจากผ่านตัวอย่างเปรียบเทียบกับสัญญาณที่ส่งเข้าไปที่ความถี่เดียวกัน หากความเข้มของสัญญาณลดลงก็แสดงว่ามีการดูดกลืนเกิดขึ้น ลักษณะการดูดกลืนก็จะเป็นพีค ซึ่งจะนำมาพล็อตเทียบกับความถี่คล้ายกับในกรณีของอินฟราเรดสเปกตรัม อย่างไรก็ตามการทำเช่นนี้จะกินเวลามาก และไม่ค่อยมีประสิทธิภาพนัก เครื่อง NMR สมัยใหม่จะใช้เทคนิคที่เรียกว่า Pulsed NMR ซึ่งจะเป็นการส่งสัญญาณคลื่นวิทยุที่ทุกความถี่ในช่วงที่สนใจเข้าไปยังตัวอย่างพร้อมๆ กัน ซึ่งจะทำให้เกิดการฟลิปของสปินทั้งหมดอย่างทันทีทันใดเรียกว่าอยู่ในสถานะถูกกระตุ้น (excited state) จากนั้นนิวเคลียสก็จะกลับเข้าสู่สถานะเดิม (ground state) พร้อมทั้งปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปของคลื่นวิทยุ เฉพาะความถี่ที่เกิดการดูดกลืน ซึ่งอาจมีมากกว่า 1 ค่าก็ได้ ความถี่ของคลื่นที่ปลดปล่อยออกมานี้จะอยู่ในรูปของคลื่นที่ซ้อนกันที่เรียกว่าสัญญาณ FID (free induction decay) ซึ่งสามารถแยกออกเป็นแต่ละความถี่ โดยที่แต่ละความถี่ก็มีความเข้มของสัญญาณที่แตกต่างกันได้โดยกระบวนการทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่าฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม (Fourier transform) ดังนั้นเครื่อง NMR สมัยใหม่จึงมักเรียกว่า FT NMR การทำฟูเรียร์ทรานสฟอร์มจะต้องใช้การคำนวณที่ซับซ้อน คอมพิวเตอร์สำหรับเก็บข้อมูลและประมวลผลจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งสำหรับ FT NMR ในขณะที่อาจไม่ใช่สิ่งจำเป็นนักสำหรับ CW NMR ข้อดีประการสำคัญของ FT NMR คือสามารถเก็บสัญญาณ FID รวมกันหลายๆ ครั้ง แล้วนำมาทำฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเพียงครั้งเดียว ซึ่งจะทำให้ได้สัญญาณที่ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะกับสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยหรือเมื่อบันทึก NMR สเปกตรัมของนิวเคลียสที่มีปริมาณน้อยในธรรมชาติเช่น ^{13}C ^{15}N เป็นต้น



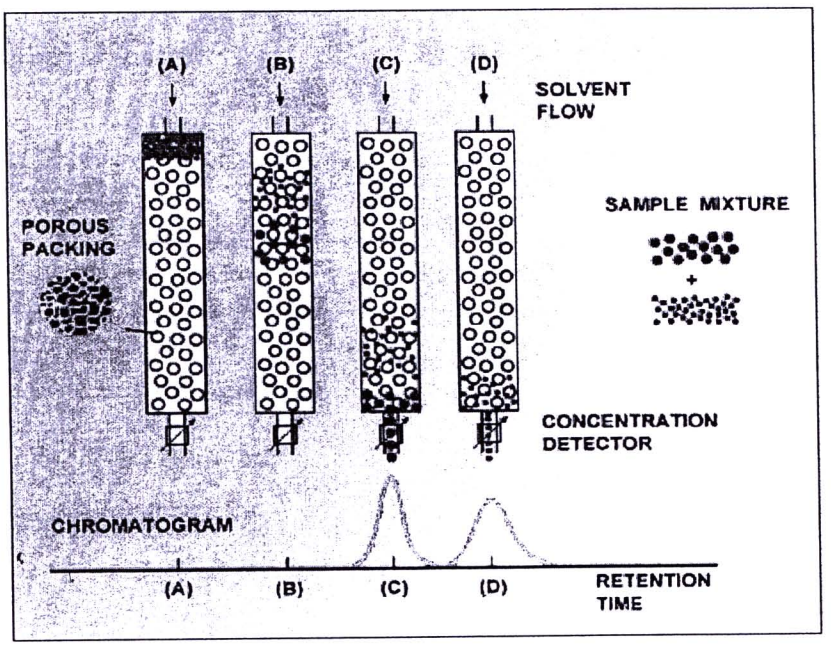
รูปที่ 2.12 องค์ประกอบของเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี

ที่มา http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/nuclear/nmr.html

(Accessed 15 August 2010)

2.10.3 เจลเพอร์มิเอชันโครมาโตรกราฟี (Gel permeation chromatography: GPC) (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2539)

เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อศึกษาการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า size exclusion chromatography (SEC) แสดงองค์ประกอบของเครื่อง GPC ในรูปที่ 2.14 เป็นวิธีแยกและตรวจหาสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง คอลัมน์ที่ใช้บรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดของรูพรุนต่างๆ กัน การเลือกขนาดของรูของตัว packing ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลของตัวถูกละลายที่ต้องการแยก มีบ่อยครั้งที่สารตัวอย่างที่ต้องการแยกประกอบด้วยตัวถูกละลายมีขนาดต่างๆ กัน (น้ำหนักโมเลกุลต่างกัน) และ packing มีรูขนาดเดียว จึงไม่สามารถแยกทุกตัวที่ละลายในสารตัวอย่างนั้นได้ เนื่องจากโมเลกุลบางตัวที่มีขนาดใหญ่กว่ารูของอนุภาคจะถูกชะออกไป และปรากฏออกมาเป็นพีคแรกและพีคเดียวในโครมาโตแกรม และพีคนี้จะมี retention volume เท่ากับ V_m ส่วนโมเลกุลตัวอื่นๆ ที่มีขนาดเล็กกว่ารูของอนุภาคก็จะแพร่ผ่านเข้าไปในอนุภาคและจะปรากฏออกมาที่ retention volume ต่างๆ กัน

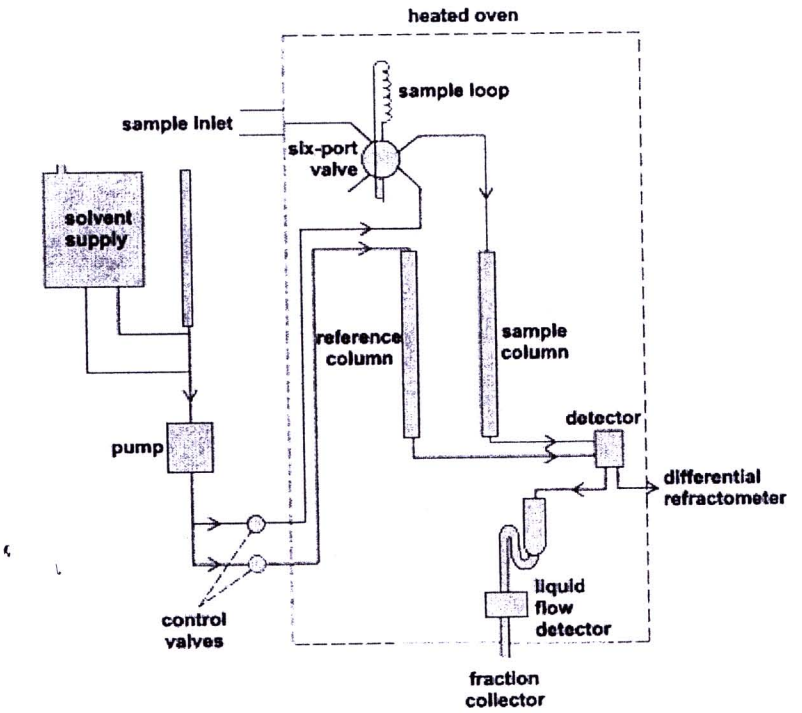


รูปที่ 2.13 กลไกการทำงานของ Gel permeation chromatography

ที่มา: http://pharamcytimes.wordpress.com/category/instrumental-analysis-studies/chromatography/ (Accessed 15 August 2010)

GPC เป็นวิธีการแยกโดยอาศัยขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ การแยกเกิดขึ้นในคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุเม็ด (bead) ของแข็งที่มีรูพรุนหรือเจล (gel) โดยทั่วไปมักใช้เม็ดพอลิสไตรีนที่ผ่านการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุล และมีรูพรุน หรือแก้วที่เป็นรูพรุน

ตัวอย่างของสารละลายพอลิเมอร์เจือจางจะถูกใส่ลงไปในคอลัมน์ และชะด้วยกระแสของตัวทำละลาย โมเลกุลพอลิเมอร์จะผ่านเม็ดรูพรุนและสามารถแพร่เข้าไปในรู ซึ่งลักษณะการแพร่นี้ขึ้นกับขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์และขนาดของรูพรุน โมเลกุลขนาดต่าง ๆ จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับขนาด โมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนได้จะผ่านคอลัมน์ออกมาก่อนเป็นอันดับแรก ส่วนโมเลกุลขนาดเล็กจะติดอยู่ในรูพรุนของเจลและใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานกว่าและถูกชะออกมาภายหลัง ดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.14 องค์ประกอบของเครื่องเจลเพอร์มิเอชันโครมาโตรกราฟี

ที่มา: http://www.answers.com/topic/gel-permeation-chromatography

(Accessed 15 August 2010)