บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พลาสติกชีวภาพ

พลาสติก เป็นวัสดุที่นิยมนำมาทำเป็นวัตถุสิ่งของต่าง ๆ ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน เนื่องจากขึ้นรูปเป็นรูปทรงต่าง ๆ ง่ายทั้งแบบเส้นใย (Fiber) หรือแผ่นฟิล์มบาง ๆ ในอดีตกระบวนการผลิตพลาสติกจะมีการเติมสารบางชนิดเพื่อทำให้เกิดความคงทนต่อสารเคมี รังสี อีกทั้งเพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้งาน แม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากพลาสติกจะทำให้เกิดความสะดวกสบายในการใช้งานแต่ในขณะเดียวกันก็ก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายได้ ปริมาณขยะเหล่านี้จึงเพิ่มสูงขึ้นทุก ๆ ปี และเพื่อเป็นการลดปัญหาที่เกิดขึ้น จึงเกิดแนวคิดในการนำพลาสติกชีวภาพซึ่งสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ผลิตได้จากปิโตรเคมี

พลาสติกชีวภาพ ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Lemiogne ในปี 1926 ซึ่งจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ แต่ถูกย่อยสลายได้โดยวิธีการทางธรรมชาติ ได้แก่ polylactic acid (PLA), polyhydroxy alkanoates (PHA), polycaprolactone (PCL), polysaccharides และ aliphatic polyesters ในปัจจุบันมีการนำพลาสติกชีวภาพในกลุ่ม PLA และ PHA มาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ประเภทบรรจุภัณฑ์ เช่น ถุงพลาสติก ขวด เป็นต้น (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547) พลาสติกชีวภาพสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ ย่อยสลายโดยอาศัยแสง (Photodegradable) กึ่งย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Semi-biodegradable) และย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ (Completely biodegradable) (Reddy et al., 2003)

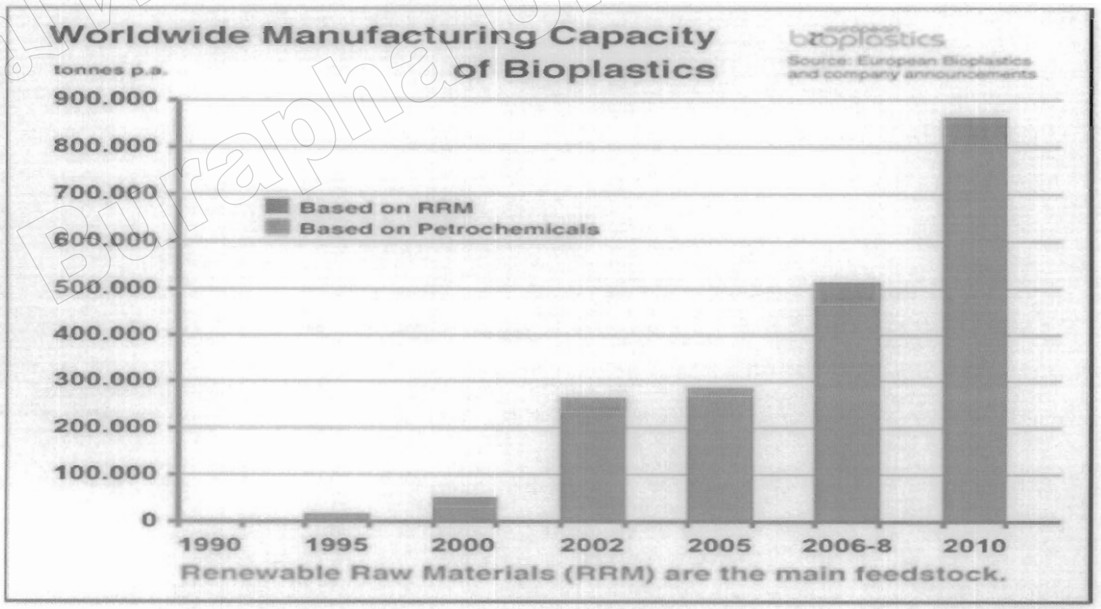
1.1 พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้โดยอาศัยแสง (Photodegradable) มีหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อแสง เช่น หมู่คาร์บอนิล เอทิลลีนิก หรืออะโรมาติก (Etylenic or Aromatic group) โดยหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้จะมีความไวต่อแสงอาทิตย์ โดยจะทำการดูดซึมรังสียูวี (หลายสัปดาห์จนถึงเดือน) ภายใต้ปฏิกิริยาเคมีที่มีแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลที่เกิดขึ้นคือ น้ำหนักโมเลกุลที่ลดลงและการแตกออกของโครงสร้างพอลิเมอร์ (ธนาวดี ลี้จากภัย, 2551)

1.2 พลาสติกกึ่งย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Semi-biodegradable) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งและ อนุพันธ์ของแป้งเป็นสารใช้เติมลงไปในผลิตภัณฑ์พลาสติกกลายเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกกึ่งย่อยสลายได้ทางชีวภาพ แนวคิดในการกำจัดพลาสติกชนิดนี้คือ เมื่อถูกนำลงบ่อฝังกลบส่วนที่เป็นแป้งจะย่อยสลายได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มช่องว่างให้กับพลาสติก มีความพรุนเพิ่มมากขึ้นส่งผลต่อการย่อยสลายชีวภาพในส่วนของพลาสติกที่เหลือได้ (ธนาวดี ลี้จากภัย, 2551)

1.3 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ (Completely biodegradable) เนื่องจากพลาสติกในกลุ่มนี้แบคทีเรียสามารถใช้และสลายให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และสารชีวมวล พลาสติกกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอท โพลีแลคติกแอซิด และโพลีคาร์โพแลคโตน เป็นต้น (ธนาวดี ลิ้จากภัย, 2551)

2. แนวโน้มการใช้และผลิตพลาสติกชีวภาพ

จากความตระหนักต่อปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะปัญหาโลกร้อนที่ทั่วโลกเผชิญอยู่ ส่งผลให้มีความต้องการผลิตภัณฑ์จากพลาสติกชีวภาพในตลาดโลกมีอัตราการเติบโตสูงขึ้น โดยพบว่า ในปี 2550-2551 มีปริมาณความต้องการใช้ทั่วโลกสูงถึง 50,000 ตันต่อปี ซึ่งมีอัตราการเติบโตถึงร้อยละ 70 เมื่อเทียบกับปี 2548 โดยเฉพาะตลาดสำคัญซึ่งมีปริมาณการใช้พลาสติกชีวภาพอย่างต่อเนื่อง ซึ่งคาดการณ์ว่า ตลาดสหภาพยุโรปมีแนวโน้มการใช้พลาสติกชีวภาพ 40,000-50,000 ตันต่อปี (ขยายตัวร้อยละ 20) ส่วนสหรัฐอเมริกา มีการใช้ 70,000-80,000 ตันต่อปี (ขยายตัวร้อยละ 16) และตลาดญี่ปุ่นมีการใช้ 15,000 ตันต่อปี (ขยายตัวร้อยละ 100) (http://www.vcharkarn.com /) แนวโน้มการใช้และการผลิตพลาสติกชีวภาพ ดังแสดงในภาพที่ 2-1



ภาพที่ 2-1 แนวโน้มการผลิตพลาสติกชีวภาพของโลก

ที่มา : http://www.vcharkarn.com 13 พฤศจิกายน 2556

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำหรับประเทศไทย มีความพร้อมในด้านวัตถุดิบสำหรับผลิตพลาสติกชีวภาพ แต่การพัฒนายังอยู่ในระดับบุกเบิกและสร้างเทคโนโลยีใหม่ และมีนักวิจัยทั่วประเทศไทยให้ความสนใจและกำลังศึกษาวิจัยด้านนี้ทั้งเรื่องของเทคโนโลยีการเตรียมวัตถุดิบทางการเกษตร รวมทั้งเทคโนโลยีในการผลิตและการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ ซึ่งปัจจุบันมีผู้ประกอบการหลายรายหันมาลงทุนในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพบ้างแล้ว แต่ยังนำเข้าเม็ดพลาสติกชีวภาพจากต่างประเทศทำให้ต้นทุนสูงกว่าพลาสติกทั่วไป 3-4 เท่า จึงทำให้ยังไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร โดยสัดส่วนและการเติบโตของพลาสติกชีวภาพชนิดต่าง ๆ ในปี ค.ศ. 2011 และการคาดการณ์ในปี ค.ศ. 2020 ในมุมมองระดับโลกและทวีปเอเชีย ดังแสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 สัดส่วนและการเติบโตของพลาสติกชีวภาพชนิดต่าง ๆ ในปี ค.ศ. 2011 และการคาดการณ์ในปี ค.ศ. 2020 ในมุมมองระดับโลกและทวีปเอเชีย โดยอาศัยข้อมูลจาก Baltus (InnoBioplast, 2013)

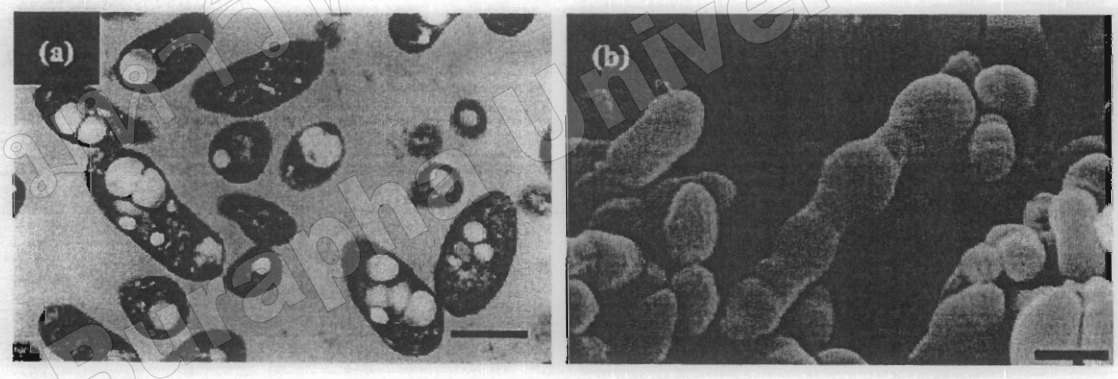
ชนิดของพลาสติก	สัดส่วนและปริมาณพลาสติกชีวภาพ				ปริมาณการผลิตที่เพิ่มขึ้น	การเติบโตตามผลผลิต
	ปี ค.ศ. 2011		ปี ค.ศ. 2020			
	(%)	(Tons)	(%)	(Tons)	(%)	(Tons)
ตลาดโลก:						
Degradable plastics:						
PBS	6	98,400	5	415,000	316,600	321.75
PBAT	5	82,000	1	83,000	1,000	1.22
PHA	2	32,800	5	415,000	382,200	1,165.24
PLA	11	180,400	10	830,000	649,600	360.09
Starch blends	20	328,000	9	747,000	419,000	127.74
Nondegradable plastics:						
PA	5	82,000	1	83,000	1,000	1.22
PET	38	623,200	60	4,980,000	4,356,800	699.10
Polyolefin	13	213,200	9	747,000	533,800	250.37
ตลาดเอเชีย:						
Degradable plastics						
PBS	5	40,000	9	351,000	311,000	777.50
PBAT	0	0	1	39,000	30,000	-
PHA	2	16,000	2	78,000	62,000	387.50
PLA	5	40,000	7	273,000	233,000	582.50
Starch blends	13	104,000	4	156,000	52,000	50.00
Nondegradable plastics:						
PA	5	40,000	1	39,000	-1,000	-2.50
PET	70	560,000	73	2,847,000	2,287,000	408.39
Polyolefin	0	0	3	117,000	117,000	-

ที่มา : http://www.vcharkarn.com 13 พฤศจิกายน 2556

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB

พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจัดเป็นสารในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (PHA) ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1926 ณ สถาบันปาสเตอร์ กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส โดยพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ค้นพบถูกสกัดจาก *Bacillus megaterium* (Jacquel et al., 2008) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตสายพอลิเมอร์ของกรดไขมันที่ชื่อว่า เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ซึ่งเป็นการสะสมสารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ การสะสมพอลิเมอร์ชนิดนี้เกิดได้ในแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhodospirillum* sp., *Halobacterium* sp., *Rhizobium* sp. เป็นต้น (Anderson & Dawes, 1990) พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นก้อนกลม ๆ คล้ายไขมันลอยอยู่ในไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (ภาพที่ 2-2) โดยพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตนี้ถูกสะสมอยู่ในแกรนูล (granule) ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานให้กับเซลล์หลังจากเซลล์ตายและเกิดการแตก พอลิเมอร์จึงถูกปล่อยออกมา (Luengo et al., 2003)



ภาพที่ 2-2 ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHB (a) ลักษณะของ PHB ที่สะสมอยู่ภายในแกรนูลของเซลล์ส่องโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และ (b) ลักษณะของเซลล์ที่มีรูปร่างเปลี่ยนไป เมื่อมีการสะสม PHB ส่องโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ที่มา : Luengo et al. (2003)

3.1 คุณสมบัติของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

ลักษณะทั่วไปของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต คือ เป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของกรด ไฮดรอกซีบิวทิริค (3-hydroxybutyric acid) มีจุดหลอมเหลว 175 องศาเซลเซียส เป็นเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) ที่มีลักษณะคล้ายเรซิน กล่าวคือ มีความหนืด

สูงและหล่อให้เป็นรูปร่างต่าง ๆ ได้ตามต้องการที่อุณหภูมิใกล้เคียงหรือสูงกว่าจุดหลอมเหลวเล็กน้อย สำหรับคุณสมบัติที่สำคัญต่อสภาวะแวดล้อม คือ เป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาผลิตสารจำพวกพลาสติก และนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ได้

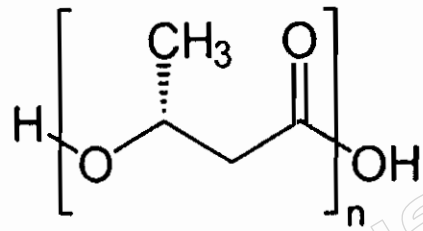
พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิโพรไพลีน (polypropylene) พอลิเอทธิลีน (polyethylene) และพอลิสไตรีน (Ojumu, Yu, & Salomon, 2004) ลักษณะทางกายภาพต่าง ๆ ของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเทียบกับพอลิโพรไพลีน ดังแสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 คุณสมบัติของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) เทียบกับพอลิโพรพิลีน (PP)

คุณสมบัติ	พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต	พอลิโพรพิลีน
จุดหลอมเหลว (°C)	175	176
การเกิดผลึก (%)	80	70
น้ำหนักโมเลกุล (x 10^5 Da)	5	2
อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (°C)	15	-10
ความหนาแน่น (g/ml)	1.25	0.905
โมดูลัส (GPa)	3.5	1.7
ความทนแรงดึง (MPa)	40	38
ความสามารถในการยืด (%)	6	400
ความต้านทานอัลตราไวโอเลต	สูง	ต่ำ
ความต้านทานตัวทำละลาย	ต่ำ	สูง

ที่มา : สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล (2547)

โครงสร้างของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตประกอบด้วย หมู่คาร์บอนิล หมู่เมทิล และออกซิเจน ดังแสดงในภาพที่ 2-3 ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยมอนอเมอร์เรียงต่อกันเป็นสาย ด้วยพันธะเอสเทอร์ประมาณ 23,000 – 35,000 มอนอเมอร์ (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต
ที่มา : Kecskemeti et al. (2006)

ข้อดีของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต คือ ไม่สร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายกับมนุษย์ แต่มีข้อเสีย คือ มีคุณสมบัติความเปราะบางสูง มีจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำมาขึ้นรูป ดังนั้นได้มีการนำพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมาปรับปรุงให้มีความแข็งแรงและคงทน โดยมีการผสมสารอินทรีย์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต หรือแป้ง แร่ไมกา ลงไปและมีการเติมเส้นใยเพื่อเสริมโครงสร้าง และเติมยางเพื่อให้ทนต่อการกระแทก เป็นต้น ซึ่งเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติและควบคุมการย่อยสลายของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้

คุณสมบัติทั่วไปของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสามารถสรุปได้ดังนี้คือ (Jogdand, 2004)

1. สามารถต้านทานต่อรังสีไวโอเลต และออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดีแต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำ

2. ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ

3. จมน้ำในขณะที่พอลิโพรพิลีนลอยตัว แต่การจมของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตก่อให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศในการตกตะกอนและไม่มีความเป็นพิษ

4. ไม่ละลายน้ำและต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (hydrolysis) ทำให้พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่น ๆ ซึ่งสามารถละลายในน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น

5. มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (biocompatible) สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

6. มีจุดหลอมเหลวที่ 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานซิสชั่น 15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 MPa

3.2 การย่อยสลายของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

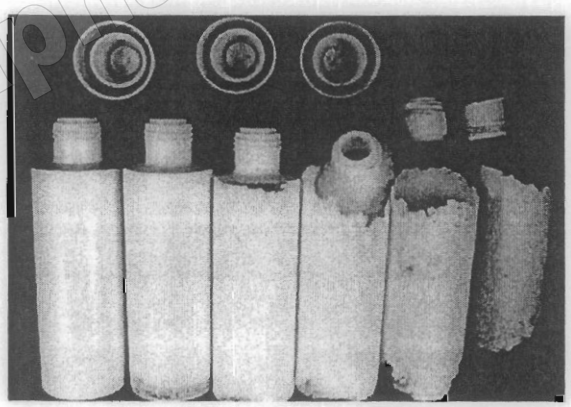
การย่อยสลายของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตตามธรรมชาติเกิดได้หลายปัจจัย เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ ลักษณะพื้นผิว อุณหภูมิ ความชื้น น้ำหนักโมเลกุล และค่าความเป็นกรดด่าง (Boopathy, 2000) โดยพอลิเมอร์ของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะถูกย่อยให้เล็กลงโดยเอนไซม์ PHB hydrolase จนได้เป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) ไตรเมอร์ (trimer) และไดเมอร์ (dimer) จากนั้นเอนไซม์ไดเมอร์ไฮโดรเลส (dimer hydrolase) จะทำให้เกิดเป็นโมโนเมอร์ของเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรตและเอนไซม์เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรตดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyrate dehydrogenase) จะทำปฏิกิริยาจนได้เป็นอะซิโตอะซิเตท(acetoacetate) จากนั้นเกิดเป็นโมเลกุลของอะซิโตอะซิติลโคเอและอะซิติลโคเอ โดยเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอไทโอไคเนส (acetoacetyl-CoA thiokinase) และเบต้า-คีโตไทโอเลส (β-kitothiolase) ตามลำดับ เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับตัวเอง (Pouton & Akhtar, 1996) การย่อยสลายของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน หากย่อยสลายในสภาวะที่มีอากาศจะทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่หากย่อยสลายภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และมีเทน (Reddy et al., 2003) การย่อยสลายนี้เกิดได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด คือ 60 องศาเซลเซียส และความชื้นประมาณร้อยละ 55 ทำให้สามารถย่อยสลายพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ภายในระยะเวลาประมาณ 7 สัปดาห์ (Johnstone, 1990; Flechter, 1993) โดยการย่อยสลายของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ในสภาวะต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 การย่อยสลายของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในสภาวะต่าง ๆ

สภาพแวดล้อม	เวลาการย่อยสลาย PHB ขนาดหนา 1 มม. (สัปดาห์)	อัตราเฉลี่ย การกัดกร่อนผิว (สัปดาห์)	การสูญหายน้ำหนัก 100% แผ่นฟิล์ม PHB (ไมครอน)
Anaerobic sewage	6	100	0.5
Estuarine sediment	40	10	5
Aerobic sewage	60	7	7
ในดินอุณหภูมิ 25°C	75	5	10
ในน้ำทะเลอุณหภูมิ 15°C	350	1	50

ที่มา : Pouton and Akhtar (1996)

จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะเกิดการย่อยสลายภายในระยะเวลา 254 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส ซึ่งลักษณะการย่อยสลายของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต แสดงดังภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 ลักษณะการย่อยสลายของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

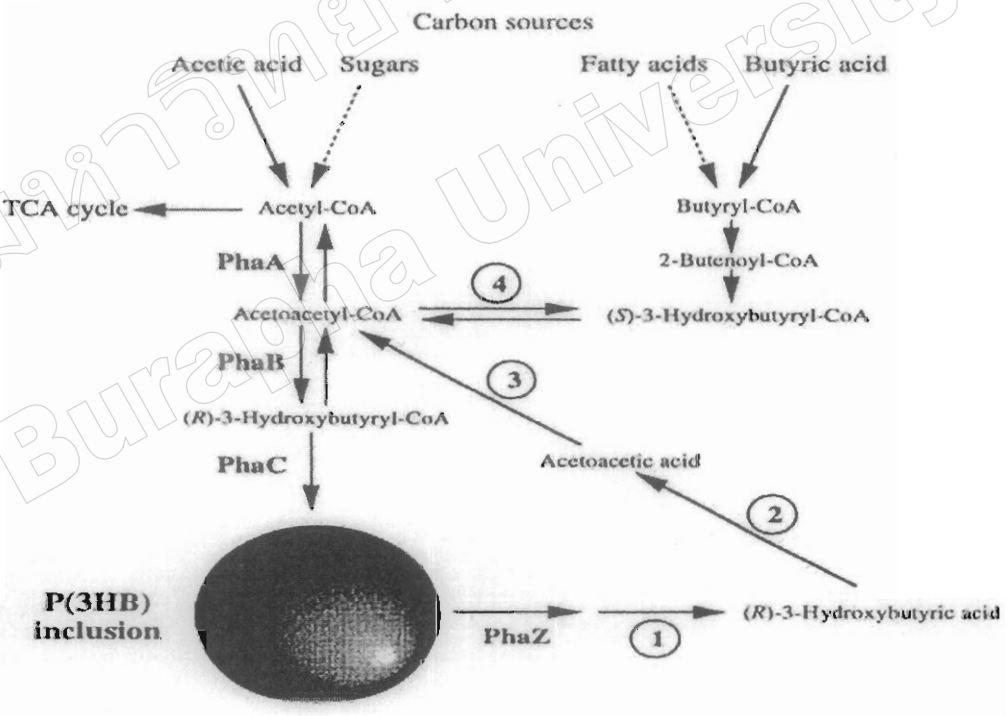
ที่มา : Madison and Huisman (1999)

4. กระบวนการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางที่เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) ผ่านวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โดยการควบคุมการผลิตพอ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

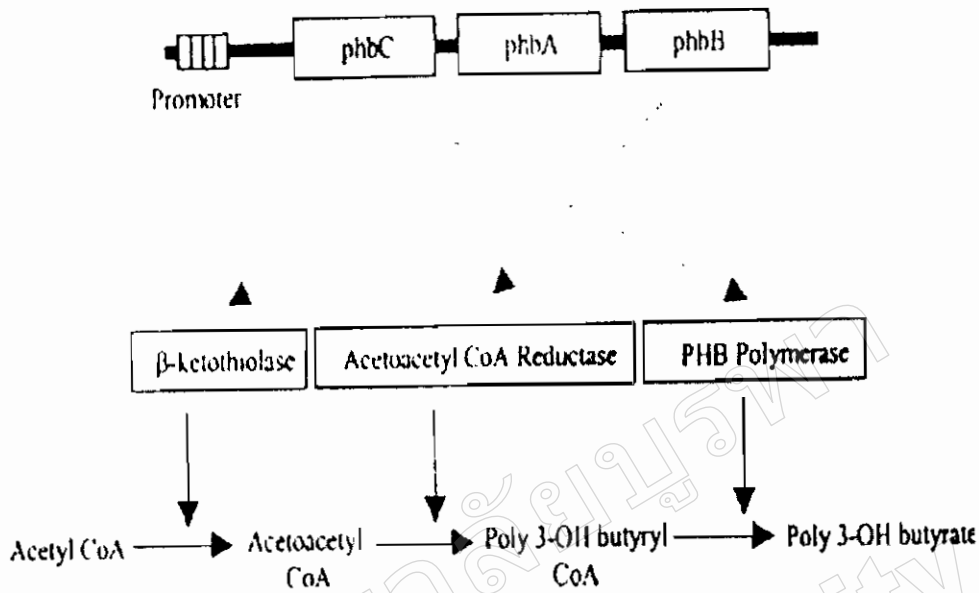
ลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเกี่ยวข้องกับ *pha* CBA cluster ซึ่งประกอบด้วยยีน *Pha*A , *Pha*B และ *Pha*C (ภาพที่ 2-5 และภาพที่ 2-6) โดย 3 ยีนนี้จะมีความเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยยีน *Pha*A จะควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนอะซิลโคเอ (Acetyl-CoA) ไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ (Acetoacetyl-CoA) ยีน *Pha*B ควบคุมการผลิตเอนไซม์อะซิโตอะซีติลโคเอรีดักเตส (Acetoacetyl-CoA reductase) โดยเปลี่ยนอะซิโตอะซิติลโคเอให้เป็นอาร์-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (R-3-hydroxybutyryl-CoA) และยีน *Pha*C เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตซินเทส (PHA synthase) ซึ่งจะสังเคราะห์พอลิเมอร์จากอาร์-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอไปเป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Sudesh, Abe, & Doi, 2000; Luengo et al., 2003; Suriyamongkol et al., 2007)



ภาพที่ 2-5 วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในแบคทีเรีย

ที่มา: Sudesh et al. (2000)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-6 การแสดงออกของ *pha* CBA cluster สำหรับการสังเคราะห์ PHB
ที่มา: Reddy et al. (2003)

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของจุลินทรีย์

การผลิตหรือการสังเคราะห์พอลิเมอร์จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์พอลิเมอร์ โดยมีปัจจัยสำคัญ ดังนี้

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต โดยพบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์แตกต่างกันจะมีผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันไป ซึ่งในการศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ได้แตกต่างกัน (Jogdand, 2004) ดังแสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 การสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จุลินทรีย์ที่สะสม PHB	การสะสม PHB (% of dry cell weight)
Alcaligenes eutrophus	69
Azospirillum	75
Azotobacter	73
Baggiatoa	57
Leptophrix	67
Methylocystis	70
Psudomonas	67
Rhizobium	57
Rhodobacter	80

ที่มา : Jogdand (2004)

จุลินทรีย์ที่มีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตขึ้นภายในเซลล์พบมากในกลุ่มแบคทีเรีย (Holmes, 1985; Verlinden et al., 2007) ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและคุณภาพของผลผลิตที่ได้แตกต่างกันโดยแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้คือ *Alcaligenes eutrophus* หรือที่รู้จักกันในชื่อ *Ralstonia eutropha* (Fatemeh & Ebrahim, 2002) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ในปริมาณสูงถึงร้อยละ 80 ของมวลเซลล์แห้ง (Mercan, Aslim, Yuksekdag, & Beyatli, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ก็มีความสามารถในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงถึงร้อยละ 87 ในระหว่างการเจริญในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนซึ่งสูงกว่าในสภาวะปกติที่ไม่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 50 (Wang & Lee, 1997) ส่วน Yezza, Halasz, Levadoux and Hawari (2007) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตจากเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenas latus* ATCC 29714 ด้วยการใช้น้ำตาลเมเปิลเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมไดแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.8 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และธาตุอาหารรองปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 33±1 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 27 ชั่วโมง พบว่ามีมวลเซลล์ 4.4±0.5 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตคิดเป็นร้อยละ 77.6±1.5 ของมวลเซลล์แห้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. แหล่งอาหาร

2.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์และสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) และภายใต้สภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล นั่นคือ มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอแต่มีการจำกัดปัจจัยอื่น เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และออกซิเจน เป็นต้น ดังนั้น ในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะทำให้ผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น โดยแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมีอยู่หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2-5

ตารางที่ 2-5 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและแหล่งคาร์บอนที่ใช้

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณ PHB (g/l)	แหล่งอ้างอิง
Alcaligenes australica	Sucrose	6.24	Gahlawat & Srivastava. (2013)
Alcaligenes latus	Sucrose	3.55	Wang et al. (2012)
Ralstronia eutropha	Soybean oil	13.00	Park & Kim (2011)
Alcaligenes eutrophus	Sugarcane juice	1.28	Waranya et al. (2011)
Alcaligenes eutropha ATCC 17696	Glucose	0.81	El-Sayed et al. (2009)
Alcaligenes latus ATCC 29712		4.94	
Alcaligenes eutrophus TISTR 1095	Sweet sorghum juice	0.03	Tanamool et al. (2008)
Alcaligenes latus ATCC 29714		0.68	
Alcaligenes latus TISTR 1403/γ-2AA (เชื้อสายพันธุ์เดิม)	Molasses	6.67	This study
Alcaligenes latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(2)/Acriflavin (เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ)		9.73	

ดังนั้นในการศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตได้ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น จากรายงานของผกาวดี นารอง (2542) พบว่า แหล่งคาร์บอนสำคัญที่แบคทีเรียนำมาใช้ในการสังเคราะห์มีหลาย

ชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส กลูโคเนต กรดอะซิติก มีเทน กรดคาร์บอลิก กรดซิตริก กรดแลกติก และกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น ส่วนการศึกษาของ Leda, David and Denise (2009) พบว่า ยังมีวัตถุดิบอื่น ๆ อีกที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตได้และมีราคาถูก เช่น กากน้ำตาล น้ำตาลซูโครส หางนม กรดไขมัน กลีเซอรอล ของเสียจากกระบวนการบำบัดน้ำ และวัสดุจำพวกเซลลูโลสและน้ำตาลที่ได้จากการสลายเฮมิเซลลูโลส (Cellulosic materials and hemicellulosic sugars) เป็นต้น จากการศึกษาของ Mona, Azza and Sanna (2001) พบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญในกากน้ำตาลอ้อย (Cane sugar molasses) ได้ดีกว่าในน้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) โดยสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตได้มากสุดเท่ากับร้อยละ 46.2 ของมวลเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 2

Chaijumrus and Udpuay (2008) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *B. megaterium* ATCC 6748 โดยใช้กากน้ำตาล (molasses) และน้ำแช่ข้าวโพด (Corn Steep Liquor) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่าหลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 45 ชั่วโมง การใช้ปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 4 และน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 4 สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด คือ 7.2 กรัมต่อลิตร และมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 16.74 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 43 ของมวลเซลล์แห้ง

Montaser et al. (2011) ศึกษาการเลี้ยง *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ 1041 เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้สูตรอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.5, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การใช้กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 6.5 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 2.95 กรัมต่อลิตร

Wang, Sharma-Shivappa, Olson and Khan (2013) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *A. latus* ATCC 29714 โดยใช้น้ำตาลหัวบีทความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.97 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า มีมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 10.30±1.01 กรัมต่อลิตร ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิว

ทิเรตเท่ากับ 4.01±0.95 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 36.66±7.28 ของมวลเซลล์แห้ง และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.22±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้แตกต่างกัน ซึ่งมักอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ เช่น แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) ยีสต์สกัด (Yeast extract) เคซีน (Casein) เนื้อสกัด (Beef extract) และทริปโตน (Tryptone) ส่วนสารประกอบอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมไนเตรต (Ammonium nitrate) ยูเรีย (Urea) แอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium oxalate) และแอมโมเนียมอะซิเตท (Ammonium acetate) (Grothe et al., 1999; Khanna & Srivastava, 2005)

Grothe et al. (1999) ที่ศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อ *A. latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัม สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 4.6 กรัมต่อลิตร

Kumar, Mudlair and Reddy (2004) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากกลุ่มจุลินทรีย์ระบบตะกอนเร่งโรงงานผลิตอาหารความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24, 96, 120, 144 และ 168 (โมลต่อโมล) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 144 มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 33

Khannafari, Akhavan and Mogharab (2006) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *Azotobacter chroococum* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ 281, 398 และ 1723 โดยใช้โปรตีนในหางนม (Milk whey) เป็นส่วนประกอบของอาหารแล้วเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แบคโตเปปโตน เคซีน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด โปรทิเอชเปปโตน และทริปโตน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ในอัตราเร็ว 122 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเนื้อสกัดจะผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดในปริมาณร้อยละ 75 ของมวลเซลล์แห้ง โดยแบคทีเรียที่มีการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมากที่สุดคือ *A. chroococum* 1723

2.3 แหล่งฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่น ๆ

การสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ เป็นต้น ซึ่งพบว่า ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ นั้นจัดเป็นแร่ธาตุหลักที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่มากพอ โดยเฉพาะฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมเนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานต่อจุลินทรีย์และพลังงานในเซลล์โดยอยู่ในรูปของพอลิเมอร์ ในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตของแบคทีเรียเกิดขึ้น เมื่อมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอแต่มีการกำจัดปริมาณของฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่นๆ เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต (ผกาวดี นารอง, 2542)

Ryu et al. (1997) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยเลี้ยง *A. eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต มีการควบคุมความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.8 อุณหภูมิในการหมัก 34 องศาเซลเซียส ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เท่ากับ 2.2, 3.1, 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นสามารถผลิตเซลล์และพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตได้สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณของเซลล์และพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตได้สูงสุดเท่ากับ 2.81 และ 2.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Grothe et al. (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการเติมและไม่มีการเติมธาตุอาหารเสริม ต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *A. latus* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติมธาตุอาหารเสริมที่ประกอบด้วย $C_6H_{11}O_7FeNO_7$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร H_3BO_3 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร $CoCl_2 \cdot H_2O$ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต สูงขึ้นถึง 3.2 กรัมต่อลิตร

2.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญมีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของจุลินทรีย์ โดย Grothe et al. (1999) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตของเชื้อ *A. latus* ATCC 29714 คือที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจจะแปรผันได้ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่ง ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต คิดเป็นร้อยละ 63 ของมวลเซลล์แห้ง

2.5 ความเป็นกรดด่าง

ความเป็นกรดด่างมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ควรควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในสภาวะเป็นกรดมากไป (Kinoshita, Kulprecha, & Chao, 1991) ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำจะขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไอออนของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารและเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเป็นพิษ เนื่องจากมีปริมาณกรดในระบบมากเกินไป (Luli & Strohl, 1990) จากการศึกษาของ Seo, Yoon, Oh and Kim (1998) รายงานว่า ความเป็นกรดด่างจะมีค่าลดลงในระหว่างที่แบคทีเรีย *Alcaligenes* มีการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) ซึ่งความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Alcaligenes* มีค่าเท่ากับ 7

เขมรัฐ เขมวงศ์ (2550) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจาก *Rhodobacter spaerodes* U7 พบว่า การปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 และ 6 ทำให้การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยมาก ขณะที่การปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 และ 8 จะทำให้ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ใกล้เคียงกัน

2.6 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เนื่องจากในสภาวะ ที่มีออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทส (Citrate synthase) และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) จะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิติลโคเอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (Luengo et al., 2003)

Satoh, Iwamoto, Mino and Matsuo (1998) ได้ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบตะกอนเร่ง 2 ระบบคือ Anaerobic–Aerobic (AA) และ Microanaerobic–Aerobic (MA) จากนั้นนำตะกอนจากระบบทั้งสองระบบมาทดสอบหาปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในถังปฏิกรณ์แบบกะ 2 แบบ คือ แบบไม่เติมออกซิเจนและแบบที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่า ตะกอนจากระบบ AA มีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน คิดเป็นร้อยละ 33 และ 22 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนในตะกอนจากระบบ MA สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ถึงร้อยละ 62 ของมวลเซลล์แห้ง

ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยใช้ *R. eutropha* TISTR 1095 พบว่า การให้อากาศ

ที่ 2 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (vvm) ทำให้เกิดการเจริญของจุลินทรีย์สูงกว่า แต่มีการสะสมปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยกว่าการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที

6. การใช้ประโยชน์ของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (พรเทพ ถนนแก้ว และตริตาภรณ์ จันทน์เทศ, 2553) สามารถนำมาใช้ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. ด้านการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผล (sutures) ตัวเย็บแผล (staples) วัสดุปิดแผล (wound dressing) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (surgical implants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (orthopedic fixation devices) วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยตัวยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. ด้านการเกษตร เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด

3. ด้านบรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะ กระดาษ

4. ด้านเส้นใย และแผ่นผ้าแบบ non-woven เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปัจจุบันได้มีการนำพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมาใช้เพื่อการค้าเพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างบริษัทที่มีการผลิตพลาสติกชีวภาพเพื่อการพาณิชย์ ดังแสดงในตารางที่ 2-6

ตารางที่ 2-6 รายชื่อสายพันธุ์จุลินทรีย์/วัตถุดิบและบริษัทที่ผลิตพลาสติกชีวภาพ

จุลินทรีย์/ วัตถุดิบ	รายชื่อบริษัท
Alcaligenes eutrophus (H16)	ZENECA Bio-products, UK (formerly ICI Ltd.)
Alcaligenes latus	Biotechnolgische Forschungs gelleschaft mbH (Austria) Petrochemia Danubia
Transgenic plants	Metabolix, Inc. (USA), Mousanto (USA), ZENECA Seeds (UK)
Starch	Warnr's Lambert (USA), Fertec, Italy, Ferruzie Technologia (Italy), Biotec (Mellita) Emmerich (Germany), BASF Ludwigshafen, (Germany), Bayer/ Wolf warlsrodeleven, (Germany) Kusen (Germany), Novamont Novara (Italy)
Recombinant *E. coli*	Bioventures Alberta inc. (Canada)
Cheaper substrates	Polyferm Inc. (Canada)
Unknown bacteria	Biocorp (USA), Asahi Chemicals and Institute of Physical and Chemical Research, (Japan)
Corn starch	SPC Biotech Pvt. Ltd. (India)

ที่มา : Reddy et al. (2003)

7. การปรับปรุงพันธุ์

การกลาย (Mutation) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงทุกชนิดที่เกิดขึ้นกับสารพันธุกรรมหรือ DNA ในเซลล์ ซึ่งไม่ได้เกิดจากการรวมตัวหรือการแยกตัวของสารพันธุกรรมตามปกติ และสามารถถ่ายทอดลักษณะการเปลี่ยนแปลงนั้น ๆ จากเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยังเซลล์ลูกได้ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์ (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2550) ซึ่งการกลายสามารถเกิดขึ้นได้ 2 แบบ ดังนี้

1. รังสี (Radiation) แบ่งเป็น 2 ประเภท (ดาวรุ่ง กังวานพงศ์, 2549) คือ รังสีที่ทำให้

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

เกิดไอออไนเซชัน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมาและรังสีคอสมิก กับรังสีที่ไม่ทำให้เกิดไอออไนเซชัน (non-ionizing radiation) ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต

1.1 รังสีเอกซ์และรังสีแกมมา มีระดับพลังงานสูง สามารถทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้ความถี่ของยีนที่กลายพันธุ์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณรังสี (dose) ที่ใช้ชักนำ รังสีที่ทำให้เกิด ไอออไนเซชันเมื่อผ่านเซลล์ จะทำให้เซลล์เกิดภาวะไอออไนเซชัน เกิดเป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ที่มีประจุบวก และประจุลบ ที่เป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย จึงเป็นผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์

1.2 รังสีอัลตราไวโอเลต มีระดับพลังงานและอำนาจทะลุทะลวงต่ำ จึงไม่ทำให้เกิดไอออไนเซชัน ดังนั้น สิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ที่ถูกรังสีนี้จึงได้รับผลเฉพาะเซลล์ชั้นบุผิว แต่รังสีอัลตราไวโอเลตจัดว่าเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ดีเอ็นเอจะดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (nm) ความถี่นี้จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์สูงสุดด้วย รังสีอัลตราไวโอเลตจะมีผลโดยตรงต่อเบส เกิดไพริมิดีนไฮเดรต (pyrimidine hydrate) และไพริมิดีนไดเมอร์ (pyrimidine dimer) ทำให้การจับคู่เบสผิด รังสีอัลตราไวโอเลตกระตุ้นให้เกิดไทมีนไดเมอร์เป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกลียวคู่ของดีเอ็นเอผิดปกติ มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยไทมีน-ไดเมอร์ขัดขวางการจำลองดีเอ็นเอ หรือทำให้กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอผิดพลาด

2. สารเคมี (Chemical) สารเคมีที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายมีหลายชนิด ดังนี้

2.1 สารที่มีโครงสร้างคล้ายเบส (Base Analog) สารกลุ่มนี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการแทนที่เบส เนื่องจากสารพวกนี้มี 2 สภาพ คือ สภาพปกติอยู่ในรูปคีโต และสภาพที่พบได้น้อย (rare state) อยู่ในรูปอีนอล เช่นเดียวกับกรณีทัวโทเมอริกชิฟต์ สารเคมีแต่ละสภาพจะจับกับคู่เบสที่แตกต่างกัน ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ได้แก่ 5BU (5-bromo-uracil) และ 2AP (2-aminopurine)

2.2 สารที่เปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติของเบส สารเคมีในกลุ่มนี้ทำให้โครงสร้าง และคุณสมบัติของเปลี่ยนแปลง สารกลุ่มนี้แบ่งตามปฏิกิริยาได้เป็น 3 ชนิด คือ

1) สารที่ดึงหมู่อะมิโนออก (Deaminating Agent) เช่น กรดไนตรัส (HNO_2) เป็นสารเคมีที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาดีอะมิเนชัน โดยดึงหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ออกจากเบสกัวนีน

338616

ไซโทซีน และอะดีนีน ทำให้โครงสร้างเบสเปลี่ยนจากรูปอะมิโนเป็นรูปคีโต และเปลี่ยนการจับคู่เบส

2) สารที่เติมหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxylating Agent) สารกลุ่มนี้ได้แก่ ไฮดรอกซีลามีน (NH_2OH) เป็นสารเคมีที่ทำปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชัน โดยเติมหมู่ไฮดรอกซิล (OH) แทนที่หมู่อะมิโนของเบสไซโทซีน เปลี่ยนไซโทซีนเป็นไฮดรอกซีลามิโนไซโทซีน (hydroxylaminocytosine) ซึ่งจะคู่กับอะดีนีนแทนกัวนีน เมื่อเกิดการจำลองดีเอ็นเอจะนำไปสู่การกลายพันธุ์แบบทรานสิชันเปลี่ยน CG เป็น TA แต่เนื่องจากไฮดรอกซีลามีนเป็นสารก่อกลายพันธุ์เฉพาะกับไซโทซีนเท่านั้น ดังนั้นการกลายพันธุ์จึงเกิดได้ทิศทางเดียว การกลายพันธุ์ย้อนกลับสามารถทำได้โดยให้ 5BU 2AP หรือกรดไนตรัส ซึ่งจะเปลี่ยน TA เป็น CG ดังเดิม นอกจากนี้ไฮดรอกซีลามีนยังมีประโยชน์ในการใช้จำแนกชนิดของการกลายพันธุ์ได้ว่า เป็นทรานสิชันแบบ TA เป็น CG หรือ CG เป็น TA ถ้าเป็น TA เป็น CG เมื่อให้ไฮดรอกซีลามีนจะไม่เกิดการกลายพันธุ์ย้อนกลับ แต่ถ้าเป็น CG เป็น TA ไฮดรอกซีลามีนจะสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ย้อนกลับได้

3) สารที่เติมหมู่แอลคิล (Alkylating Agent) เป็นสารเคมีที่เติมหมู่แอลคิล (เมทิล $-CH_3$ หรือ เอทิล $-CH_2-CH_3$) ให้กับเบสของดีเอ็นเอ ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ เช่น แก๊สมัสตาร์ด (sulfur mustard) เมทิลมีเทนซัลฟอเนต (methyl methanesulfonate - MMS) เอทิลมีเทนซัลฟอเนต (ethyl methansulfonate - EMS) และไนโตรโซกัวนิดีน (nitrosoguanidine - NTG) สารกลุ่มนี้ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบต่างๆ เช่น ทรานสิชัน ทรานสเวอร์ชัน เฟรมชิฟต์

2.3 สารที่แทรกในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (Intercalating Agents) สารก่อกลายพันธุ์กลุ่มนี้ เช่น สารในกลุ่มอะคริดีน (acridine) มีคุณสมบัติทำให้โครโมโซมแตกหัก ได้แก่ โพรฟลาวิน (proflavin) อะคริฟลาวิน (acriflavine) เอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างเบสในดีเอ็นเอ โดยอาจแทรกในสายใดสายหนึ่งหรือทั้งสองสาย ถ้าสารกลุ่มนี้เข้าแทรกระหว่างเบสในสายที่เป็นแม่พิมพ์ เมื่อดีเอ็นเอจำลองตัวเอง ดีเอ็นเอสายใหม่ที่จำลองจากเส้นแม่พิมพ์จะสุ่มเอาเบส 1 เบสเข้าไปแทรกในตำแหน่งที่อยู่ตรงข้ามกับสารก่อกลายพันธุ์ ในที่นี้สมมุติเป็น G ต่อมาดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่มีเบส G เพิ่มขึ้นมานี้จำลองตัวเองต่อๆไป ได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่มีเบส CG เพิ่มขึ้นมา 1 คู่ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดเฟรมชิฟต์ แต่ถ้าสารก่อกลายพันธุ์กลุ่มนี้เข้าแทรกในดีเอ็นเอเส้นใหม่ แล้วหลุดหายไปในเวลาต่อมา เมื่อเกิดการจำลองดีเอ็นเอ จะได้ดีเอ็นเอที่มีเบส

ขาดหายไป 1 คู่ คือ TA ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดเฟรมชิฟต์เช่นกัน ดังนั้น สารก่อกลายพันธุ์กลุ่มนี้ ทำให้คู่เบสเพิ่มหรือขาดหายไปและเกิดการกลายพันธุ์ชนิดเฟรมชิฟต์ สารกลุ่มนี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ย้อนกลับ ถ้าให้สารตัวเดิมเป็นครั้งที่สอง

ปัจจุบันพบว่า ได้มีงานวิจัยจำนวนมากศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อให้เกิดการกลายด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อช่วยให้เชื้อสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงขึ้น เช่น

Hikmet et al. (2003) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Bacillus* โดยทำการเหนี่ยวนำด้วยวิธีต่าง ๆ คือ การใช้สารอะคริฟลาวิน ความเข้มข้น 80-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การใช้สาร 5-โบรโมยูราซิล ความเข้มข้น 80-180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการใช้รังสีเหนือม่วงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวด้วยวิธีต่าง ๆ สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮ ดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดร้อยละ 63.45 ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เดิมซึ่งผลิตได้ร้อยละ 15.62

Quillaguaman et al. (2005) ระบุว่า *Alcaligenes latus, Wautersia eutropha, Azotobacter vinelandii, Pseudomonas* และ *E. coli* ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรม (recombinant *Escherichia coli*) สามารถสะสม PHB ไว้ภายในเซลล์ได้ในปริมาณสูง (ร้อยละ 60-80) เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะแบบกะ (batch) และกึ่งกะ (fed-batch)

Divyashree and Shamala (2009) ศึกษาการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. flexus* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจากนั้นนำ *B. flexus* ที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 5, 10, 20 และ 40 กิโลเกรย์ (kGy) พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 45 ของมวลเซลล์แห้ง และช่วยให้น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเพิ่มสูงขึ้นจาก $1.5x10^5$ ถึง $1.9x10^5$ พร้อมทั้งยังเพิ่มความทนแรงดึงจาก 18 ถึง 20 เมกะปาสคาล (MPa) หลังจากได้รับรังสีปริมาณ 10 กิโลเกรย์

Vu et al. (2009) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการเหนี่ยวนำเชื้อ *Aspergillus* sp. ซ้ำ โดยเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ทำการเหนี่ยวนำด้วยรังสีแกมมา 2 ครั้ง ที่ 0.5 และ 2 กิโลเกรย์ ตามด้วยรังสีเหนือม่วง เป็นเวลา 5 นาที และเหนี่ยวนำซ้ำอีก 4 ครั้งด้วยสารเมธิลไนโตรไนโตรโซกวานิดีน (MNNG) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำด้วยวิธีดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ร้อยละ 202.7 ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 2.03 เท่า ในขณะที่วิธีที่ 2 ทำการเหนี่ยวนำด้วยรังสีแกมมา 2 ครั้ง เหมือนวิธีที่ 1 จากนั้นจึงนำไปเหนี่ยวนำซ้ำด้วยสารเมธิลไนโตรไนโตรโซกวานิดีนความเข้มข้น

100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับรังสีเหนือม่วง 3 ครั้ง พบว่าเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำด้วยวิธีนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ร้อยละ 128.2 ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 1.28 เท่า

8. วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Shojaosadati, Kolaei, Balaeipour, & Farroul, 2008)

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยทั่วไป สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีหลัก ได้แก่ การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch) แบบเติมกะ (Fed-batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous) ซึ่งแต่ละวิธีมีวิธีการการควบคุม รวมถึงระยะเวลาในการดำเนินการแตกต่างกัน โดยในการเลือกใช้นั้นต้องใช้ปัจจัยต่าง ๆ ในการตัดสินใจ เช่นชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ รวมถึงผลผลิตที่ต้องการ และเทคนิคต่างๆซึ่งจะเป็นตัวช่วยให้กระบวนการเพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพดีขึ้น

8.1 การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch) (Shojaosadati et al., 2008)

เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการหมักโดยการเตรียมอาหารครั้งเดียวเท่านั้น เซลล์จะใช้สารตั้งต้นต่าง ๆ ได้จากสารอาหารเริ่มต้นเพียงอย่างเดียว เนื่องจากหลังจากการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นไปแล้วนั้น จะไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เข้าไปอีก รวมถึงไม่มีการนำสิ่งใดออกระหว่างการหมักด้วย ซึ่งจะทำการเก็บน้ำหมักทั้งหมดเพียงครั้งเดียว เมื่อครบกำหนดเวลาการหมักที่กำหนดไว้ กล่าวได้ว่าใน การหมักแบบเบ็ดเสร็จแต่ละครั้งต้องมีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นใหม่ทุกครั้ง การหมักแบบนี้เป็นที่นิยมมากในโรงงานอุตสาหกรรม โดยเป็นถังหมักสำหรับใส่สารอาหารและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก มีระบบการกวนเพื่อให้เกิดการผสมกันอย่างทั่วถึง มีการควบคุมอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ จนได้ผลผลิตตามที่ต้องการ จึงถ่ายออกเพื่อเข้าสู่กระบวนการเก็บเกี่ยวในขั้นต่อไป

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาตรไม่มากนัก

2. เชื้อจุลินทรีย์จะมีความแข็งแรง เนื่องจากการใช้หัวเชื้อที่เตรียมใหม่ทุกครั้ง และยังทำให้เกิดการผ่าเหล่า (mutation) ได้ยาก

3. การควบคุมให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงทำได้ง่าย เนื่องจากไม่มีการเปิดระบบเพื่อนำสารอาหารเข้าหรือออก จึงเกิดการปนเปื้อนได้ยาก

4. การควบคุมทำได้ง่ายไม่สลับซับซ้อน เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้อุปกรณ์ในการดำเนินการน้อยมาก

ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. ต้องเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นและวัตถุดิบต่าง ๆ ใหม่ทุกครั้งที่ดำเนิการหมัก ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก

2. ต้องเสียเวลารอเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง เนื่องจากเป็นหัวเชื้อที่เตรียมใหม่ จึงต้องมีการปรับสภาวะของจุลินทรีย์ สามารถใช้อาหารได้

8.2 การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-batch) (Shojaosadati et al., 2008)

เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องหรือเป็นช่วงๆหลังจากที่ใส่หัวเชื้อเริ่มต้นแล้ว โดยไม่มีการถ่ายออก ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงแบบกะที่ปริมาตรอาหารในการหมักแบบเติมกะจะเพิ่มขึ้นตลอดเวลาไม่คงที่ ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเติมกะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักมากที่สุด เช่น การผลิตยีสต์ทำขนมปัง การผลิตเพนนิซิลินเป็นต้น

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

1. ช่วยลดการยับยั้งของอาหาร (substrate inhibition) สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น แอลกอฮอล์ กรดน้ำส้ม เมทานอล และสารประกอบพวกอะโรมาติก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ แม้ในความเข้มข้นน้อย ๆ การเติมสารอาหารเหล่านี้ในปริมาณที่เหมาะสมอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยปราศจากการยับยั้งของสารอาหาร

2. ช่วยลดผลจากกลูโคส (glucose effect) คือ การที่มีกลูโคสในระบบการเพาะเลี้ยงมากเกินไป ส่งผลให้เกิดสภาวะการขาดแคลนออกซิเจน ซึ่งทำให้เซลล์มีการสร้างเป็นสารอื่นขึ้นมาแทนการสร้างเซลล์ โดยสารที่สร้างขึ้นมาอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตได้

3. ช่วยลดความหนืดของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ หรือผลผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น เดกซ์แทรน (dextran) และแซนแทน กัม (xanthan gum) การค่อย ๆ เติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องสามารถควบคุมความหนืดของน้ำหมักได้ เนื่องจากสารอาหารที่ค่อย ๆ เติมลงไปจะเข้าไปช่วยในการเจือจางน้ำหมักที่มีความหนืดมากได้ ซึ่งหากความหนืดในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ใบกวนจะต้องใช้กำลังไฟเพิ่มมากขึ้นเกิดฟองมากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ

4. สามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เนื่องจากเป็นระบบที่มีเพียงการเติมสารอาหารเท่านั้น ทำให้ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงนั้นไม่ถูกเจือจาง จึงทำให้ได้เปรียบมากกว่าเชื้อชนิดอื่น

8.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous) (Shojaosadati et al., 2008)

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด จำนวนจุลินทรีย์จะถูกรักษาสมดุลโดยการดึง น้ำหมักออกบางส่วนแล้วแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ในอัตราการไหลที่เท่ากันระหว่างน้ำหมักที่ออกมาและอาหารใหม่ที่เติมเข้า ทำให้ปริมาตรภายในอยู่ในสภาะคงที่หรือสภาวะสมดุล (steady state)

ระบบการหมักอย่างต่อเนื่องแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ chemostat และ turbidostat โดย chemostat เป็นการเพาะเลี้ยงที่อัตราการเติมสารอาหารถูกตั้งไว้ที่ค่าหนึ่งและอัตราการเจริญของเซลล์ปรับตามอัตราการไหล ส่วน turbidostat เป็นวิธีที่ค่าความขุ่นของเซลล์จะถูกตั้งไว้ในระดับที่คงที่โดยการปรับอัตราการไหล ในทางปฏิบัติ ระบบการหมักแบบ chemostat ง่ายกว่า turbidostat เพราะสามารถทำได้โดยการปั๊มที่อัตราการไหลคงที่ ส่วน turbidostat ต้องใช้อุปกรณ์ตรวจวัดความขุ่น (optical sensing) และเครื่องควบคุมอื่น ๆ ซึ่งมีความยุ่งยากมากกว่า

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

1. สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ให้คงที่ได้ เนื่องจากมีการเติมสารอาหารใหม่ตลอดเวลา ควบคู่กับการดึงสารอาหารเก่าออกพร้อมกับเซลล์บางส่วน ทำให้ปริมาณหัวเชื้ออยู่ในปริมาณคงที่ และมีสารอาหารใหม่เข้าไปให้ใช้เท่ากัน

2. สามารถศึกษาผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญและ การสร้างผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่

3. สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่ได้โดยการปรับค่าอัตราการเจือจางให้คงที่

ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

1. ไม่เหมาะกับการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ เนื่องจากเซลล์จะถูกดึงออกจากระบบการหมักในขณะที่เซลล์ยังอยู่ในขั้นตอนของการเจริญเติบโต ซึ่งอาจยังไม่เข้าขั้นตอนที่เซลล์มีการสร้างผลิตภัณฑ์

2. การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง จะทำให้การเจริญของเซลล์เป็นแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานาน ซึ่งอาจเป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์จากการแทนที่ของสายพันธุ์อื่น ที่ปนเปื้อนเข้ามาและเจริญเติบโตได้เร็วกว่า

3. การเจริญในช่วงเวลานานอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อนได้

วิธีการขยายขนาดเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีได้สูงขึ้น ซึ่งพบว่า ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น

Jiang et al. (2008) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* A2a5 ซึ่งเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตรอาหารที่มีน้ำอ้อย (Sugarcane Liquor) ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียมกลูตาเมต ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด คือ 32 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต 22 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

El-Sayed et al. (2009) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Ralstonia eutropha* ATCC 17697 และ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงแบบกะและเติมกะ โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 2 ลิตร ซึ่งใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิในถังเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7±0.1 และความเร็วของใบพัดเท่ากับ 750 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่า *R. eutropha* ATCC 17697 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 10.18 และ 0.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *A. latus* ATCC 29714 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.73 และ 4.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 1.2 ลิตร ซึ่งใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมน้ำตาลกลูโคสในชั่วโมงที่ 25 และ 35 พบว่า *R. eutropha* ATCC 17697 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 16.32 และ 10.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *A. latus* ATCC 29714 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 15.21 และ 8.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Kulpreecha, Boonruangthavan, Meksiriporn and Thongchul (2009) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 ลิตร ด้วยสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่ง

ไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.80 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 5.41 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 61.60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 2.5 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมงโดยเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 72.60 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 30.50 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 42.1 ของมวลเซลล์แห้ง

Park and Kim (2011) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเชื้อ *Ralstonia eutropha* KCTC 2662 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 1 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.8 เติมอากาศที่ 1 vvm และปรับความเร็วของใบพัดเท่ากับ 700-1300 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 87 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 13 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 1 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง และเติมน้ำมันถั่วเหลืองในชั่วโมงที่ 18 และ 50 พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 32 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร

Gahlawat and Srivastava (2013) ศึกษาการเลี้ยง *Azohydromonas australica* เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 4 ลิตร ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 33 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า ผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.71 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 6.24 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72 ของมวลเซลล์แห้ง และทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 2 ลิตร ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีการเติมสารอาหารตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20-35 เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และ

ทำการเพาะเลี้ยงจนครบ 38 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 29.71 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 22.65 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ 3.6 เท่า

Tripathi, Srivastawa and Singh (2013) ศึกษาการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. NCIM 5085 เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7.5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 5.6 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้สูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 34 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 11.0±0.5 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 8.58±0.4 กรัมต่อลิตร ผลผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดและความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.78 และ 0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University