# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## พอลิเอสเทอร์ทางชีวภาพ

พอลิเอสเทอร์ทางชีวภาพหรือพลาสติกชีวภาพ มีการศึกษาลักษณะเป็นครั้งแรกโดย Lemiogne ในปี 1926 ในกรุงปารีส โดยมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ แต่สามารถถูกย่อยสลายหรือสลายตัวได้โดยวิธีการตามธรรมชาติ ได้แก่ polyhydroxyalkanoates (PHA), polycaprolactone (PCL), polylactic acid (PLA), aliphatic polyesters และ polysaccharides ในปัจจุบันได้มีการนำ PLA และกลุ่ม PHA มาใช้ทางการค้าทดแทนพลาสติกประเภทบรรจุภัณฑ์ เช่น ขวด ถุงพลาสติก เป็นต้น ซึ่งกลุ่มของ PLA มีข้อจำกัดคือไม่คงรูปเมื่อได้รับความร้อน ส่วนพลาสติกชนิด PHA มีสมบัติทางกลดีกว่า เหมาะกับการขึ้นรูปด้วยความร้อน (Thermal forming) (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547) โดยพอลิเมอร์ชนิดนี้มีอนุพันธ์หลายชนิดด้วยกัน และที่สำคัญคือ PHA เป็นพอลิเมอร์กลุ่มเดียวที่ใช้กระบวนการสังเคราะห์ทั้งหมดเกิดขึ้นในจุลินทรีย์ (Aamer et al., 2008)

## พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์หลายชนิดในลักษณะเม็ดแกรนูลภายใต้สภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล เช่น ขาดแคลนไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือออกซิเจน แต่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ เพื่อใช้เป็นพลังงานสำรอง พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตประกอบด้วยมอนอเมอร์ของกรดไฮดรอกซี (Hydroxyl acid , HA) มากกว่า 100 ชนิด (Yezza et al., 2006) โดยมีคุณสมบัติเชิงกลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของมอนอเมอร์ (Lee, 1996) ซึ่งมีองค์ประกอบของโครงสร้างอยู่ในรูปของกรดไขมัน R-(3)-hydroxy fatty acid มีโครงสร้าง ดังภาพที่ 2-1 น้ำหนักโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอยู่ในช่วง 200,000 - 3,000,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะในการเจริญ (Sudesh et al., 2000) ดังตารางที่ 2-1

องค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีหน่วยย่อยของมอนอเมอร์ชนิดต่าง ๆ รวมกันเกิดเป็นพอลิเมอร์สายยาวหรือสายสั้นขึ้นอยู่กับจำนวนมอนอเมอร์ที่มาต่อรวมกัน (Doi, 1990) เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้น (Shot chain length PHAs หรือ sci-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีคาร์บอนไม่เกิน 5 อะตอม พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลาง (Medium chain length PHAs หรือ mcl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีคาร์บอน 6-14 อะตอม และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ยาว (Long chain length PHAs หรือ lcl-PHA)ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีคาร์บอนมากกว่า 14 อะตอม ทั้งนี้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้นจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีมากที่สุด ขณะที่พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางจะมีคุณสมบัติเป็นอิลาสโตเมอร์ (Elastomers) และยาง (Rubber) (Suriyamongkol et al., 2007) นอกจากนี้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ โฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์

1. โฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer)

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกัน เช่น การเชื่อมต่อกันของกรดไขมันชนิดไฮดรอกซีบิวทิเรต (Hydroxybutyrate, HB) ซึ่งมีหมู่เมทิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีมอนอเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate, PHB) โดยมีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ พอลิโพรพิลีน หรือพอลิเอทิลีน (Khanna & Srivastava, 2005)

2. โคพอลิเมอร์ (Copolymer)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของมอนอเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีวาลีเรต (Poly-β-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่เป็นไฮดรอกซีบิวทิเรต (HB) ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ที่เกิดแบบสุ่มและมีโอกาสเกิดได้สูงประมาณร้อยละ 50 โดยเฉพาะสายไฮดรอกซีวาลีเรต (HV) เกิดได้ตั้งแต่ร้อยละ 0-95 โมล ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้ดีขึ้น โดยสัดส่วนของไฮดรอกซีวาลีเรตยิ่งสูงจะช่วยให้โคพอลีเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น จุดหลอมเหลวลดลง มีความสามารถยืดหยุ่นและมีค่าการยืดตัว (Elongation) เพิ่มขึ้นจึงสามารถเพิ่มคุณภาพของพอลิเมอร์ได้โดยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV ให้เหมาะสม (Khanna & Srivastava, 2005)

**พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB**

พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1926 จาก *Bacillus megatrium* จัดอยู่ในกลุ่มของ PHA ที่มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ (Jacquel et al., 2008) ดังแสดงในตารางที่ 2-2 แต่มีความเปราะกว่า โดย PHB สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้ (Jogdand, 2004)

1. ใช้เป็นตัวห่อหุ้มยาที่ย่อยสลายได้ เพื่อค่อย ๆ ปลดปล่อยยาที่บรรจุอยู่ภายในออกมาอย่างช้า ๆ
2. ใช้เป็นสารกำจัดแมลง วัชพืชหรือใช้เป็นปุ๋ย
3. อุปกรณ์ที่ใช้ครั้งเดียว ตัวอย่างเช่น มีดโกน เครื่องใช้ในครัวเรือน ผ้าอ้อม ขวดแชมพู กล่องบรรจุเครื่องสำอาง ถ้วยพลาสติก เป็นต้น
4. ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารพวก chiral compound
5. การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

ตารางที่ 2-2 คุณสมบัติของ PHB เทียบกับพอลิโพรพิลีน (PP)

| คุณสมบัติ | PHB | พอลิโพรพิลีน |
|---|---|---|
| จุดหลอมเหลว | 175 | 176 |
| การเกิดผลึก | 80 | 70 |
| น้ำหนักโมเลกุล ($x10^5$ ดาลตัน) | 5 | 2 |
| อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน | 15 | -10 |
| ความหนาแน่น (กรัม/มิลลิลิตร) | 1.25 | 0.905 |
| โมดูลัส (Gpa) | 3.5 | 1.7 |
| ความทนแรงดึง (Mpa) | 40 | 38 |
| ความสามารถในการยืด (%) | 6 | 400 |
| ความต้านทานอัลตราไวโอเลต | สูง | ต่ำ |
| ความต้านทานตัวทำละลาย | ต่ำ | สูง |

ที่มา: ดัดแปลงจาก Evan and Sikder (1990) ; Lee (1996) ; Ojumu et al. (2004)

PHB สามารถสังเคราะห์ได้ถึงร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมือนกับพอลิโพรพิลีน หรือ พอลิเอทิลีน ยังสามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยเพื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ คุณสมบัติโดยทั่วไปของ PHB สามารถสรุปได้ดังนี้ (Jogdand, 2004)

1. ไม่ละลายน้ำและสามารถต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) ทำให้ PHB ต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่น ๆ ซึ่งสามารถละลายในน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น

2. สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตร้าไวโอเรต และออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี แต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำ

3. ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่น ๆ

4. มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible) สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

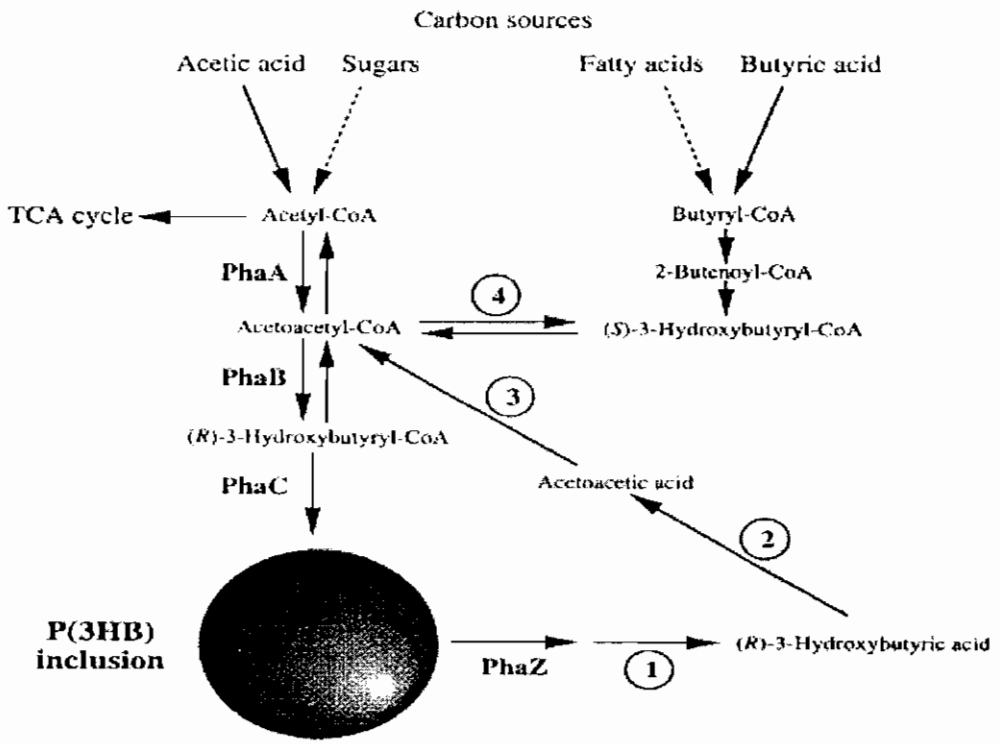
5. มีจุดหลอมเหลวที่ 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานซิสชั่น (Transition) 15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 MPa

6. จมน้ำในขณะที่พอลิโพพิลีนลอยตัว แต่การจมตัวของ PHB ก่อให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศในการตกตะกอนและไม่มีความเป็นพิษ

## กระบวนการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

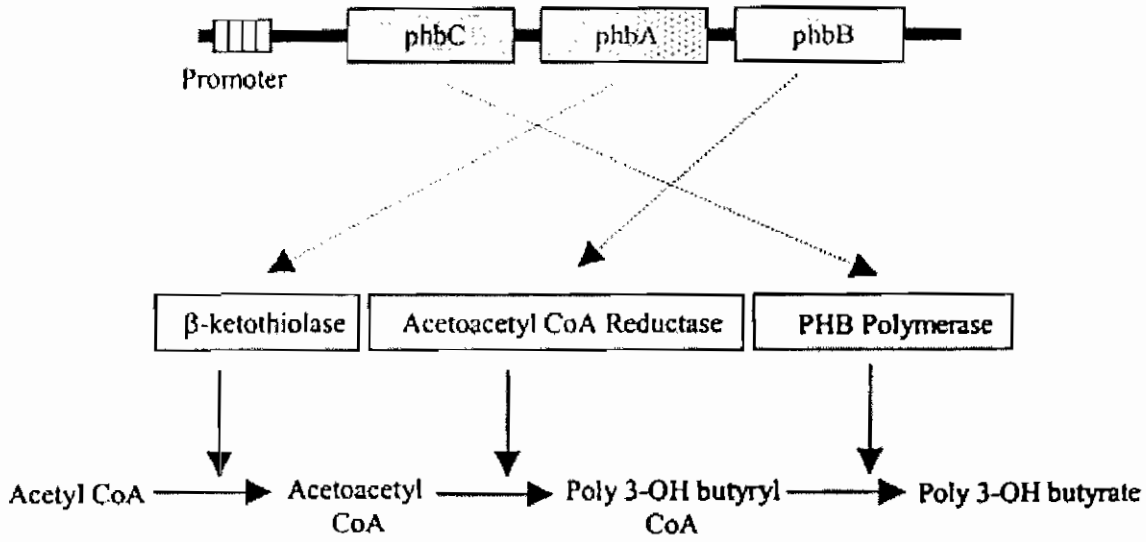
วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางที่เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) ผ่านวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โดยการควบคุมการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเกี่ยวข้องกับ *pha* CBA cluster ซึ่งประกอบด้วยยีน *Pha*A, *Pha*B และ *Pha*C (ภาพที่ 2-2 และ 2-3) โดยยีน *Pha*A ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนอะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA)ไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) ยีน *Pha*B ควบคุมการผลิตเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (Acetoacetyl-CoA reductase) โดยเปลี่ยนอะซีโตอะซีติลโคเอให้เป็นอาร์-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (R-3-hydroxybutyryl-CoA) และยีน *Pha*C เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตซินเทส (PHA synthase) ซึ่งจะสังเคราะห์พอลิเมอร์จากอาร์-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ ไปเป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Sudesh et al., 2000; Luengo et al., 2003; Suriyamongkol et al., 2007) และยีน *Pha*P ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของ กรานูลของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้แก่ โปรตีนฟาซิน (Phasing) ซึ่งเป็นโปรตีนมวลโมเลกุล

ต่ำ มีหน้าที่ส่งเสริมการผลิตและ การจับกับกรานูลเพื่อควบคุมขนาดจำนวน และพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต อย่างไรก็ตามการควบคุมขนาดและจำนวนของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตยังขึ้นกับปริมาณของยีน *PhaC* ที่มีอยู่ในเซลล์ด้วย และยังมียีน *PhaZ* ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิต เอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (Depolymerase) เพื่อใช้ปลดปล่อยมอนอเมอร์ออกจากพอลิเมอร์ โดยเอนไซม์ที่ยีน *PhaZ* ผลิตออกมาจะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานได้ด้วย PHB และสารกระตุ้นเช่น ทริปซิน (Trypsin) ดังนั้นการสลายกรานูลของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยดีพอลิเมอร์เรสต้องอาศัยเอนไซม์โปรติโอไลติก (Proteolytic) อื่นร่วมด้วย (Luengo et al., 2003)




ภาพที่ 2-2 วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในแบคทีเรีย

ที่มา: Sudesh et al., (2000)




ภาพที่ 2-3 การแสดงออกของ *phaCBA* cluster สำหรับการสังเคราะห์ PHB

ที่มา: Reddy et al., (2003)

## ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB ของจุลินทรีย์

การผลิตหรือสังคราะห์พอลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้น จำเป็นต้องคำนึงปัจจัยหลายประการที่จะมีผลต่อชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ เนื่องจากมีกลไกการสังเคราะห์ที่ซับซ้อน สามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ PHB ที่ต้องการ มีปัจจัยที่สำคัญดังนี้

### 1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต จากการศึกษาผลของสายพันธุ์จุลินทรีย์ พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กันก็จะมีผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย (Anderson & Wynn, 1995) กล่าวคือบางสายพันธุ์ของจุลินทรีย์อาจจะผลิตพอลิเมอร์ออกมาในรูปโฮโมพอลิเมอร์ ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิดพอลิเมอร์ออกมาในรูปโคพอลิเมอร์ นอกจากนี้มีการศึกษาถึงการผลิต PHB จากจุลินทรีย์หลายชนิดพบว่า จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ได้แตกต่างกัน

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตขึ้นภายในเซลล์ พบมากในกลุ่มแบคทีเรีย (Holmes, 1985; Verlinden et al., 2006) ดังแสดงในตารางที่ 2-3 ซึ่งแบคทีเรียแต่ละ

ชนิดจะมีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต และคุณภาพของผลผลิตที่ได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้คือ *Alcaligenes eutrophus* หรือที่รู้จักกันในชื่อ *Ralstonia eutropha* (Fatemeh & Ebrahim, 2002) เป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ง่าย และสามารถสร้าง PHB ได้ในปริมาณสูง คือมากกว่าร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Mercan et al., 2002) โดยใช้แหล่งคาร์บอนอย่างง่าย (Lee,1996) ซึ่ง Grothe et al. (1999) รายงานว่าแบคทีเรีย *A. eutrophus* สามารถสะสม PHB ได้เมื่อถูกจำกัดสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสเฟต แต่มีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอสำหรับการเจริญ โดยในระยะแรกที่มีสารอาหารที่ความเข้มข้นสูงแบคทีเรียจะมีการเจริญและสร้างมวลเซลล์ จากนั้นในระยะที่สองแบคทีเรียจึงมีการสะสม PHB ขึ้นภายในเซลล์เมื่อสารอาหารเริ่มลดน้อยลง

ตารางที่ 2-3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB ได้ในธรรมชาติ

| **จุลินทรีย์ที่สะสม PHB** | |
|---|---|
| *Alcaligenese** | *Derxia* |
| *Azotobactor** | *Ferrobacillus* |
| *Actinomycetes* | *Methylobacterium** |
| *Azospirillum* | *Nocardia* |
| *Bacillus* | *Lampropaedia* |
| *Beijerinckia* | *Rhodospirillum* |
| *Chromatium* | *Rhizobium* |
| *Chromobacterium* | *Sspirillum* |
| *Chlorogloea* | *Sphaerotilus* |
| *Hyphomicrobium* | *Streptomyces* |
| *Micrococcus* | *Pseudomonas** |

ที่มา: Lee (1996) ; Reddy et al. (2003) ; Lucngo et al. (2003) ; Chaijamrus and Udpuay (2008)

<u>หมายเหตุ</u> * จุลินทรีย์สะสม PHB ที่นิยมนำมาศึกษา

Wang and Lee (1997) รายงานการเลี้ยง *Alcaligenes latus* สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงถึงร้อยละ 87 ในระหว่างการเจริญในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสูงกว่าในสภาวะการเจริญปกติที่ไม่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 50 โดยพบว่ามีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่

สามารถสะสม PHB ได้ในระหว่างการเจริญเช่นเดียวกับ *Alcaligenes latus* เช่น *Azotobacter vinelandii* (Shi, Lee, & Ma, 2007)

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

Khanna and Srivastana (2005) เลี้ยงแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ NRRL B14690 โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วยฟรุคโตส 10 และ 40 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ธาตุอาหารรองปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อลิตร และเติมยีสต์สกัด (yeast extract) 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าได้มวลเซลล์สูงสุด 3.25 กรัมต่อลิตร และให้ปริมาณ PHB เท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร และ พบว่าการเติมยีสต์สกัดช่วยให้ผลิต PHB เพิ่มขึ้นถึง 2.66 กรัมต่อลิตร

Yezza et al. (2007) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Alcaligenes latus* สายพันธุ์ ATCC 29714 ด้วยการใช้น้ำตาลเมเปิลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมไดแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.8 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และธาตุอาหารรองปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 33 ± 1 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 27 ชั่วโมง พบว่ามีมวลเซลล์ 4.4 ± 0.5 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ PHB คิดเป็นร้อยละ 77.6 ± 1.5 ของน้ำหนักเซลล์

**2. แหล่งอาหาร**

2.1 แหล่งคาร์บอน

มีความสำคัญในการผลิต PHB กระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHB จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดและภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือเมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอแต่มีการจำกัดปัจจัยบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส เป็นต้น ดังนั้น ในการศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จึงจะทำให้เกิดการผลิต PHB ได้ดียิ่งขึ้น พบว่าในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ PHB ได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต และแหล่งคาร์บอนที่ใช้

| สายพันธุ์จุลินทรีย์ | แหล่งคาร์บอน | ปริมาณ PHB (g/L) | แหล่งอ้างอิง |
|---|---|---|---|
| *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 | Sweet sorghum juice | 0.034 | Tanamool et al. (2008) |
| *Alcaligenes lactus* ATCC 29714 | | 0.68 | |
| *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 | Carboxylic acid from palm oil | 0.64 | ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2549) |
| *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 | Cassava starch hydrolysate | 3.10 | ปิยวรรณ บุญมาโค และ พิมพ์ชนก นาคราช (2548) |
| *Cupriavidus* sp. KKU38 | Cassava starch | 1.81 | Plangklang et al. (2010) |
| *Alcaligenes latus* I-14 | Glucose | 5.25 | Chomchai and Chongchroen (2010) |
| | Glucose+maltose | 4.05 | |
| *Rhodobacter sphaeroides* N20 | Glutamic acid | 7.8 | Sangkharak and Prasertsan (2007) |
| *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 | Glucose | 0.95 | This study |
| *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 /γ | Glucose | 0.70 | |
| *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 /2AA | Glucose | 0.47 | |
| *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 /γ- 2AA | Glucose | 0.80 | |
| | Cassava pulp hydrolysate | 2.08 | |

ผกาวดี นารอง (2542) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนสำคัญที่แบคทีเรียนำมาใช้ในการสังเคราะห์ มีหลายชนิดเช่น กลูโคส ฟรุคโตส กลูโคเนต (Gluconate) กรดอะซิติก (Acetic acid) บีเทน (Betaine) กรดคาร์บอลิก (Cabolic acid) กรดซิตริก (Citric acid) กรดแลคติก (Lactic acid) กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) เป็นต้น ส่วน Leda et al. (2009) พบว่ายังมีวัตถุดิบชนิดอื่น ๆ ที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต PHB ได้และมีราคาถูก ได้แก่ กากน้ำตาล ซูโครส หางนม กรดไขมัน กลีซอรอล ของเสียจากกระบวนการบำบัดน้ำ และวัสดุจำพวกเซลลูโลสและน้ำตาลที่ได้จากการสลายเฮมิเซลลูโลส (Cellulosic materials and hemicellulosic sugars) เป็นต้น

Silva et al. (2004) นำเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลาย (Cellulose hydrolysate) มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA โดย *Burknolderia cepacia* และ *Burknolderia sacchari* พบว่าสามารถผลิต PHA ได้ปริมาณสูงร้อยละ 53 และ 62 ตามลำดับ

Quillaguaman et al. (2005) สามารถผลิต PHB จาก *Halomonas boliviensis* ได้สูงสุด คิดเป็นร้อยละ 56 โดยใช้แป้งที่ผ่านการย่อยสลาย (Starch hydrolysate) เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนรายงานของ Mona et al. (2001) พบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญในกากน้ำตาลอ้อย (Cane sugar molasses) ได้ดีกว่าในน้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) โดยสามารถผลิต PHB ได้มากที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 46.2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 2 ส่วนปิยวรรณ บุญมาโค และพิมพ์ชนก นาคราช (2548) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 โดยใช้ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่า *A. eutrophus* NCIMB 11599 สามารถผลิต PHB ได้สูงเท่ากับ 3.10 กรัมต่อลิตร

Chien et al. (2007) เลี้ยงแบคทีเรีย *Vibrio* spp. 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ M11, M14, M20 และ M31 ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลเพื่อผลิต PHB โดยทำการเลี้ยงในอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน และความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าสายพันธุ์ M11 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้โซเดียมอะซิเตตเข้มข้นสูงถึง 7.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แต่สามารถผลิต PHB ได้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 30.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สายพันธุ์ M14 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 12.3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณมากสุด คิดเป็นร้อยละ 45.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สายพันธุ์ M20 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้ กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 15.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิต PHB ได้สูงสุดร้อยละ 42.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และสายพันธุ์ M31 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 14.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 24.0 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้แตกต่างกัน เช่นเดียวกันแหล่งคาร์บอน โดยแหล่งไนโตรเจนที่นิยมนำมาใช้มีทั้งอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) เคซีน (Casein) ยีสต์สกัด (Yeast extract) เนื้อสกัด (Beef extract) โปรติเอสเปปโตน (Protease peptone) และทริปโตน (Tryptone) รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียไนเตรต ยูเรีย แอมโมเนียมอะซิเตท แอมโมเนียมออกซาเลต เป็นต้น (Grothe et al., 1999; Khanna & Srivastava, 2005; Omar et al., 2001)

Ramsay et al. (1990) รายงานว่า *Alacaligenes latus* และ *Alcaligenes eutrophus* ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 6.7 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร โซเดียมคาร์บอเนต 0.5 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัม เฟอรัสแอมโมเนียมซิเตท 0.06 กรัม และธาตุอาหารรอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอัตราเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจนถึง 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า *A. eutrophus* สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 33 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ *A. latus* สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 40 ของน้ำหนักเซลล์

Khanafari et al. (2006) ศึกษาการผลิต PHB จาก *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 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารสกัดจากเนื้อจะมีผลผลิต PHB สูงที่สุดในปริมาณร้อยละ 75 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งแบคทีเรียที่มีการผลิต PHB มากที่สุดคือ *Azotobacter chroococum* 1723

Khanna and Srivastava (2006) ศึกษาความเหมาะสมของระยะเวลาและความเข้มข้นของการเติมไนโตรเจนในการเลี้ยงแบคทีเรีย *R. eutropha* NRRL B14690 แบบเติมกะในถังหมักปริมาตรบรรจุ 7 ลิตร ที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้คงที่ที่ร้อยละ 30 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 โดยทำการเติมไนโตรเจน (7 กรัมต่อลิตร) ที่อัตราการเติม 70 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 20 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 30 นาน 10 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำตาลฟรุคโตส (300 กรัมต่อลิตร) ที่อัตราการเติม 80 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากชั่วโมงที่ 24 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 34 เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 50 *R. euthopha* มีการผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 32 กรัมต่อลิตร มีปริมาณ PHB 14 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงแบบกะที่มีปริมาณการผลิตมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 19.68 กรัมต่อลิตร

Chaijamrus and Udpuay (2008) รายงานการเลี้ยง *B. megaterium* ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.3 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.3 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมคาร์บอเนต 0.5 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร เฟอริกซิเทต 0.5 กรัมต่อลิตร และ ธาตุอาหารรองปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอัตราเร็ว 130 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 50 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่ามีการผลิต PHB ได้ในปริมาณร้อยละ 43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีอัตราการผลิต PHB เท่ากับ 0.016 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.25 ต่อชั่วโมง

นอกจากนี้ปัจจัยสำคัญในการผลิต PHB คือต้องมีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากการผลิต PHB จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่มากเกินพอ แต่ถูกจำกัดออกซิเจน ไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัส (Sangkharak & Prasertsan, 2008 ; Luengo et al., 2003) จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดย Kumer et al. (2004) รายงานการผลิตพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรตจากกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบตะกอนเร่งจากโรงงานผลิตอาหารที่มีความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24, 96, 120, 144 และ 168 (โมลต่อโมล) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 144 มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุด เท่ากับร้อยละ 33 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2007) ที่ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 (โมลต่อโมล) เมื่อใช้ตะกอนสลัดในระบบเอสบีอาร์ (SBR) และใช้กรดบิวทิริก (butyric acid) และกรดวาเรอริก (valeric acid) เป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นกรดเริ่มต้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 100 ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมากที่สุด เท่ากับ 30.3 กรัมต่อกรัมเซลล์ และการที่จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัด คืออัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับไนโตรเจนมีค่าสูง ก็ส่งผลให้จุลินทรีย์มีการผลิต PHB ได้ในปริมาณที่แตกต่างกันไป

2.3 อุณหภูมิ

ในการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha, Alcaligenes latus* หรือ *Azotobacter chroococcum* ให้ได้ปริมาณสูง ที่เหมาะสมอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส (Fatemeh & Ebrahim, 2002; Zhang et al., 2004; Wang & Lee, 1997; Kim & Chang, 1998) โดย Grothe et al. (1999) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิต PHB ของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 คือที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสซึ่งอาจจะผันแปรได้ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งปริมาณ PHB คิดเป็นร้อยละ 63 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.4 ความเป็นกรดด่าง

ความเป็นกรดด่างเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ PHB เนื่องจากมีผลต่อความสามารถในการนำแร่ธาตุบางชนิดหรือสารอาหารไปใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (Grothe et al., 1999) ในสภาวะที่ความเป็นกรดด่างขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไอออนของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์จนส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารและเซลล์ โดยไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเป็นพิษเนื่องจากปริมาณกรดในระบบมากเกินไป (Luli & Strohl, 1990) จากการศึกษาของ Seo et al. (1998) รายงานว่าความเป็นกรดด่างจะมีค่าลดลงในระหว่างที่แบคทีเรีย *Alcaligenes* มีการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) ซึ่งความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Alcaligenes* มีค่าเท่ากับ 7 และพบว่าการใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) เป็นบัฟเฟอร์ในการควบคุมความเป็นกรดด่างมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย *A. eutrophus* ATCC 17699 โดยใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากในระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรียเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เพื่อควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยก๊าซที่เกิดขึ้นแบคทีเรียสามารถนำมาให้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้ และไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญของ *A. eutrophus* ATCC 17699

2.5 แหล่งฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่น ๆ

แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิต PHB ได้เมื่อมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ แต่มีการจำกัดปริมาณของฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่นๆ ดังนั้นจึงต้องมีการจำกัดปริมาณของฟอสฟอรัสและแร่ธาตุแต่ละชนิดให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต (ผกาวดี นารอง, 2542; Ryu et al., 1997)

Chen et al. (2001) ศึกษาการผลิต poly (3-hydroxy-butyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] จาก *Aeromonas hydrophila* 4AK4 ในถังปฏิกรณ์ขนาด 20,000 ลิตร ซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการเติมกรดลอริก ภายใต้สภาวะจำกัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส พบว่า *Aeromonas hydrophila* 4AK4 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA) ภายใต้สภาวะจำกัดไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวได้ปริมาณร้อยละ 22 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อทำการเลี้ยงในสภาวะจำกัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสพบว่า *Aeromonas hydrophila* 4AK4 สามารถผลิต PHA ได้เพิ่มขึ้น 2.3 เท่า โดยมีสัดส่วนของโคพอลิเมอร์ 3HHx เพิ่มขึ้นร้อยละ 13.5 (mol%)

Ryu et al. (1997) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีปริมาณฟอสเฟตจำกัด มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.8 โดยใช้

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริค อุณหภูมิในการหมัก 34 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีการจำกัดแหล่งฟอสฟอรัสโดยใช้โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) เท่ากับ 2.2, 3.1, 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นสามารถผลิตเซลล์และ PHB ได้สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเซลล์และผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 281 และ 232 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.6 ปริมาณออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB เนื่องจากสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรตซินเทส (Citrate synthase) และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) ถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิติลโคเอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (Luengo et al., 2003)

Guocheng et al. (2001) เลี้ยงแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* ในระบบต่อเนื่องสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการผลิตมวลเซลล์ให้มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด โดยมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen) ไม่ให้ต่ำกว่าร้อยละ 20 และอัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรของอากาศ/ปริมาตรของเหลว/นาที (vvm) พบว่าในขั้นแรกมีอัตราการเจริญที่ดีโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 22.0 เป็น 27.1 กรัมต่อลิตรและสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงที่สุดในขั้นตอนที่สอง คือ 30.5 กรัมต่อลิตร

Shahrokh (2004) เลี้ยง *Ralstonia eutropha* ACM 1296 ในถังหมัก ปริมาตรบรรจุ 2 ลิตร แบบกึ่งต่อเนื่อง ที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้คงตัว อัตราการให้อากาศอยู่ในช่วง 1.5-2.0 ปริมาตรของอากาศ/ปริมาตรของเหลว/นาที โดยใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดมีค่าเท่ากับ 7.5 กรัมต่อลิตร

Plabo et al. (2006) รายงานว่า *E. coli* ที่มีการตัดต่อยีน *pha*A จาก *Azetobactor sp.* สายพันธุ์ FA8 สามารถสะสม PHB ได้มากถึงร้อยละ 72.9 ของน้ำหนักเซลล์แห้งในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีความสามารถในการผลิต PHB เท่ากับ 2.18 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำไม่ให้ต่ำกว่าร้อยละ 30

Nath et al. (2008) เลี้ยง *Methylobacterium sp.* ZP24 เพื่อผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์โดยใช้สูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนใสจากหางนมร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตสามารถผลิต PHB เพิ่มขึ้น 4.58 เท่า ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำไม่เพียงพอ

## การกลาย

การกลาย (Mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงในลำดับเบสหรือโครงสร้างของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตให้ผิดไปจากสภาพธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ การกลายสามารถเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ การกลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และการกลายที่เกิดเนื่องจากสารชักนำ ซึ่งนิยมการใช้รังสีหรือสารเคมี เนื่องจากเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายน้อย

### 1. การใช้รังสีเหนี่ยวนำให้กลาย (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540)

รังสีที่นิยมใช้เหนี่ยวนำให้กลาย ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา และรังสีนิวตรอนจัดไว้ในกลุ่มของไอออนไนซิงเรดิเอชั่น (Ionizing radiation) เนื่องจากมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการทำให้เกิดไอออนไนเซชั่น แก่อะตอม หรือโมเลกุลที่ได้รับรังสีได้ ส่วนรังสีอุตราไวโอเลต (Ultraviolet) มีการนำมาใช้น้อย เนื่องจากมีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำ มีพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้เกิดไอออนไนเซชั่น แต่อย่างไรก็ตามรังสีอุลตราไวโอเลตในช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนมิเตอร์ (nm) เป็นช่วงคลื่นที่กรดนิวคลีอิกดูดกลืนพลังงานจากรังสีอัลตราไวโอเลตได้ดี จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับยีนได้ แต่ขอบเขตการใช้มีจำกัด

สำหรับการกลายด้วยรังสีแกมมา (Gamma-rays) ซึ่งเป็นรังสีประเภทคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเช่นเดียวกับรังสีเอกซ์ ทำให้เกิดไอออนไนเซชัน (Ionization)ได้ รังสีแกมมาเกิดจากการสลายตัวของนิวเคลียสของเรดิโอนิวไคลด์ (Radio nuclides) ในปฏิกิริยาการสลายตัวนิวเคลียสของเรดิโอนิวไคลด์ ซึ่งมีสภาพไม่เสถียรพยายามปรับตัวให้เข้าสู่สภาพเสถียร โดยการปลดปล่อยพลังงานส่วนเกินออกมาในรูปของรังสีแอลฟา (Alpha Ray) หรือรังสีบีตา (Beta Ray, β) และติดตามด้วยการสลายตัวให้รังสีแกมมา เรดิโอนิวไคลด์ที่นิยมใช้เพื่อให้รังสีแกมมา คือ โคบอลท์-60 (Cobalt-60) และซีเซียม-137 (Cesium-137)

### 2. การใช้สารเคมีเหนี่ยวนำให้กลาย

สารเคมีหลายชนิดมีคุณสมบัติในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้ โดยสารเคมีก่อกลายพันธุ์แบ่งตามปฏิกิริยาที่เข้าทำอันตรายต่อ DNA ได้เป็น 7 ชนิดใหญ่ ๆ และยังมีสารเคมีอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถจัดเข้าไว้ในหมวดหมู่ใดได้

1. แอลคิเลชัน (Alkylation) สารในกลุ่มนี้จัดว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติก่อกลายพันธุ์ได้ดีในพืชเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิเลชั่นกับหมู่ฟอสเฟต เบสพิวรินและ ไพริมิดินได้ เช่น Ethyleneimine, Diethyl sulphate

2. แอริลเลชัน (Arylation) สารเคมีในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารพวกปฏิชีวนะ และพวกโพลิไซคลิกอะโรเมติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbon) มีฤทธิ์ก่อให้เกิดการกลายพันธ์ เช่น aromatic amine, arylamine, Acetylaminofluorene และ 2- aminoanthracene (2-AA) ซึ่งทำให้การกลายระดับยีน (DNA mutation) ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนของรหัสพันธุกรรม (Frameshift Mutation) คือ การกลายพันธุ์โดยการเพิ่มหรือสูญหายของนิวคลีโอไทด์ 1 นิวคลีโอไทด์หรือมากกว่า (Frederick & Fred, 1985)

3. อินเทอร์คาเลชัน (Intercalation) สารเคมีในกลุ่มนี้ทำงานโดยแทรกตัวเข้าไปยังโมเลกุล DNA เช่น Actinomycin D

4. เบสแอนาลอกอินคอร์พอเรชัน (Base analogue incorporation) เป็นกลุ่มสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับนิวคลีโอไทพ์เบส เช่น แอนาลอกพิวริน มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสพิวริน หรือเบสแอนาลอกของไพริมิดิน มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสไพริมิดิน สารในกลุ่มนี้จะเข้าไปแทนที่เบสจริงได้ เมื่อ DNA มีการจำลองตัว เช่น 5-Bromouracil

5. ดีอะมิเนชัน (Deamination) สารเคมีในกลุ่มนี้มีความสามารถในการเคลื่อนย้ายหมู่อะมิโนออกไปจากเบส กัวนิน ไทมิน ไซโตซิน และอะดินินได้ ทำให้คุณสมบัติในการจับคู่ของเบสต่างไปจากเดิม เช่น กรดไนตรัส (Nitrous acid, $HNO_2$)

6. เมตะเฟสพอยซัน (Mataphase poison) สารเคมีที่จัดไว้ในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทำงานคล้ายคลึงกับโคลชิซิน (Colchicine) ทำปฏิกิริยาโดยการขัดขวางการเกิดของเส้นใยสปินเดิล (Spindle fiber) และขัดขวางการแยกจากกันของโครโมโซม โดยการเข้ารวมตัวกับองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนของไมโครทิวบิวส์ ซึ่งจะมาเป็นเส้นใยสปินเดิลสารเคมีเหล่านี้สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของโครโมโซมและเพิ่มจำนวนพลอยดี (Ploidy) ได้ เช่น Hydroguinole

7. เอนไซม์อินฮิบิเตอร์ (Enzyme inhibitor) สารเคมีในกลุ่มนี้ทำงานโดยการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซม DNA ทำให้เกิดความผิดพลาดในการซ่อมแซม DNA ได้ เช่น Hydroxyurea, Azaserine

ในการกลายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตพอลิเมอร์ พบว่า Hikmet et al. (2003) ทำการเหนี่ยวนำแบคทีเรียเพื่อผลิต PHB ได้แก่ *Bacillus megaterium* Y6, *B. subtilis* K8, *B. sphaericus* X3 และ *B. firmus* G2 ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี acriflavine และ 5 bromourasil พบว่าแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ส่วน Divyashree et al. (2009) ศึกษาการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus flexus* โดยใช้ซูโครสเป็น

แหล่งคาร์บอน จากนั้นนำ *B. flexus* ที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 5, 10, 20 และ 40 kGy พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 45 ของน้ำหนักเซลล์เมื่อได้รับรังสีแกมมา (5-40 kGy) และทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ PHB เพิ่มสูงขึ้นจาก $1.5 \times 10^5$ ถึง $1.9 \times 10^5$ พร้อมทั้งยังเพิ่มความทนแรงดึงจาก 18 ถึง 20 เมกะปาสกาล (MPa) หลังจากได้รับรังสีปริมาณ 10 kGy

ดังนั้นวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถช่วยทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพได้มีคุณภาพดีและมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น และในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาใช้ในเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยการ over expression ยีน *Pha* ชนิดต่าง ๆ เช่น การทำ recombinant *E.coli* จากการตัดต่อยีน *Pha*C ของ *Pseudomonas* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต mcl-PHA synthase เพื่อทำให้เกิดการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่มีสายโซ่กลางขึ้น (Suriyamonkol et al., 2007)