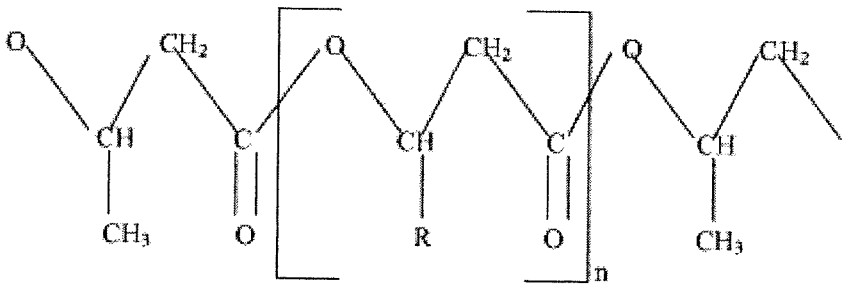
บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในลักษณะเม็ดแกรนูล ลักษณะของ PHA นั้นจะประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-hydroxy-acid (HA) เช่น poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นพลังงานสำรองสำหรับแบคทีเรีย และยังพบว่ามีสาร HAs มากกว่า 80 ชนิด โดยจะมีคุณสมบัติเชิงกลแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ (Lee, 1996; Doi, 1990)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีองค์ประกอบของโครงสร้างอยู่ในรูปของกรดไขมัน R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R-β-hydroxy fatty acid โดยมีโครงสร้างทั่วไปดังภาพที่ 1 น้ำหนักโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอยู่ในช่วง 200,000 – 3,000,000 ดาลตันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะในการเจริญของเชื้อ (Sudesh *et al.*, 2000)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต
ที่มา : Khanna และ Srivastava (2005)

องค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีหน่วยย่อยของมอนอเมอร์ชนิดต่างๆ รวมกันเกิดเป็นสายพอลิเมอร์ยาวหรือสั้นขึ้นอยู่กับจำนวนมอนอเมอร์ที่มาต่อรวมกัน (Doi, 1990) ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้น (short chain length PHAs หรือ scl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีคาร์บอนไม่เกิน 5 อะตอม, พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลาง (medium chain length PHAs หรือ mcl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีคาร์บอน 6-14 อะตอม และ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ยาว (long chain length PHAs หรือ lcl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีคาร์บอน

มากกว่า 14 อะตอม โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้นจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีมากที่สุด ขณะที่พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางจะมีคุณสมบัติเป็น elastomers และ ยาง (rubber) (Suriyamongkol *et al.*, 2007) นอกจากนี้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตยังสามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์ ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โฮโมพอลิเมอร์ และ โคพอลิเมอร์

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกัน เช่น การเชื่อมต่อกันของกรดไขมันชนิดไฮดรอกซีบิวทิเรต (hydroxybutyrate, HB) ซึ่งมีหมู่เมธิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีมอนอเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-β-hydroxybutyrate, PHB) โดยมีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์คือ พอลิโพรพิลีนหรือพอลิเอทิลีน ซึ่งสามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยเพื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ (Khanna and Srivastava, 2005) ขณะที่โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยมอนอเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีวาลีเรต (poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่เป็นไฮดรอกซีบิวทิเรต (HB) และไฮดรอกซีวาลีเรต (hydroxyvalerate, HV) ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ที่เกิดแบบสุ่มและมีโอกาสเกิดได้สูงประมาณ 50% โดยเฉพาะไฮดรอกซีวาลีเรต (HV) เกิดได้ตั้งแต่ 0-95%โมล ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้ดีขึ้น โดยสัดส่วนของไฮดรอกซีวาลีเรตยิ่งสูงจะช่วยให้โคพอลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น จุดหลอมเหลวลดลง มีความยืดหยุ่น และมีค่า elongation เพิ่มขึ้น ดังนั้น สามารถเพิ่มคุณภาพของพอลิเมอร์ได้โดยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV ให้เหมาะสม (Khanna and Srivastava, 2005)

2.2 Polyhydroxybutyrate (PHB)

PHB สามารถสังเคราะห์ได้ถึง 80% ของน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย มีคุณสมบัติทางกายภาพเหมือนกับพอลิโพรพิลีนหรือพอลิเอทิลีน ทำให้สามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยเพื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถนำมาผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมในจำนวนมากได้เนื่องจากราคาสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์ (Khanna and Srivastava, 2005) คุณสมบัติโดยทั่วไปของ PHB สามารถสรุปได้ดังนี้ (Jogdand, 2004)

1. PHB ไม่ละลายน้ำและสามารถต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไรซีส ทำให้ PHB ต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น

2. PHB สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตร้าไวโอเลตและออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี แต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำ

3. PHB ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ

4. PHB มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (biocompatible) และในขณะนี้มีการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

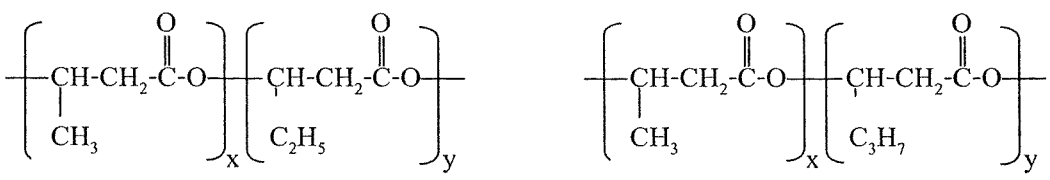
5. PHB มีจุดหลอมเหลวที่ 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานซิสชัน 15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 MPa

6. PHB จมน้ำในขณะที่พอลิโพรพิรีนลอยตัว แต่การจมตัวของ PHB ก่อให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศในการตกตะกอนและไม่มีความเป็นพิษ

นอกจากคุณสมบัติต่างๆ ของสาร PHB ที่กล่าวมานี้แล้ว PHB ยังมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีนซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 1

2.3 Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

Poly - (hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) [P(HB-*co*- HV) หรือ PHBV] เป็นโคพอลิเมอร์ที่เกิดแบบสุ่ม ซึ่งมีโอกาสเกิดได้สูง (~50%) โดยเฉพาะ 3-hydroxyvalerate (3-HV) เกิดได้ตั้งแต่ 0-95% โมล ระหว่างการเกิดผลึกโมโนเมอร์ของ 3-hydroxybutyrate (3-HB) และ 3-HV นอกจากนี้ยังมีการเกิดโคพอลิเมอร์แบบสุ่มชนิดอื่นๆ ประกอบด้วย 3-HB and 3-hydroxyhexanoate (3-HHx) (ภาพที่ 2) ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้ดีขึ้น ได้มีการศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของโคพอลิเมอร์ของ 3HB และ 3HV อย่างกว้างขวาง มีลักษณะ isodimorphic พบว่าสัดส่วนของ 3HV ยิ่งสูงจะช่วยให้โคพอลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น มีความยืดหยุ่น ดังตารางที่ 2 พบว่าค่า elongation จะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าเมื่อเพิ่มสัดส่วนของ 3HV จุดหลอมเหลวจะลดลง ดังนั้น สามารถเพิ่มคุณภาพของพอลิเมอร์ได้โดยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV ให้เหมาะสมได้



(A) (B)

ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ (A) P(HB-*co*-HV) and (B) P(HB-*co*-HHx)

ที่มา : Tian และคณะ (2002)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ PHB เปรียบเทียบกับ PP

Parameter	**PHB**	**Polypropylene (pp)**
Melting point Tm [^{0}C]	171-182	171-186
Glass Transition Temperature Tg [^{0}C]	5-10	-15
Crystallinity [%]	65-80	65-70
Density [g cm^{-3}]	1.23 - 1.25	0.905 - 0.94
Molecular weight Mw (x10^{-5})	1 – 8	2.2 - 7
Molecular weight distribution	2.2 – 3	5 - 12
Flexural modulus [GPa]	3.5 – 4	1.7
Tensile strength [MPa]	40	39
Extension to break [%]	6 – 8	400
UV resistance	Good	poor
Solvent resistance	Poor	good
Oxygen permeability [cm^{3}m^{-2}atm^{-1}d^{-1}]	45	1700
Biodegradability	Good	-
US Annual production M. tones	not determined	1.8
Other	due to more density goes to the sediment in aquatic system.	due to low density floats in aquatic system

ที่มา : Jogdand (2004)

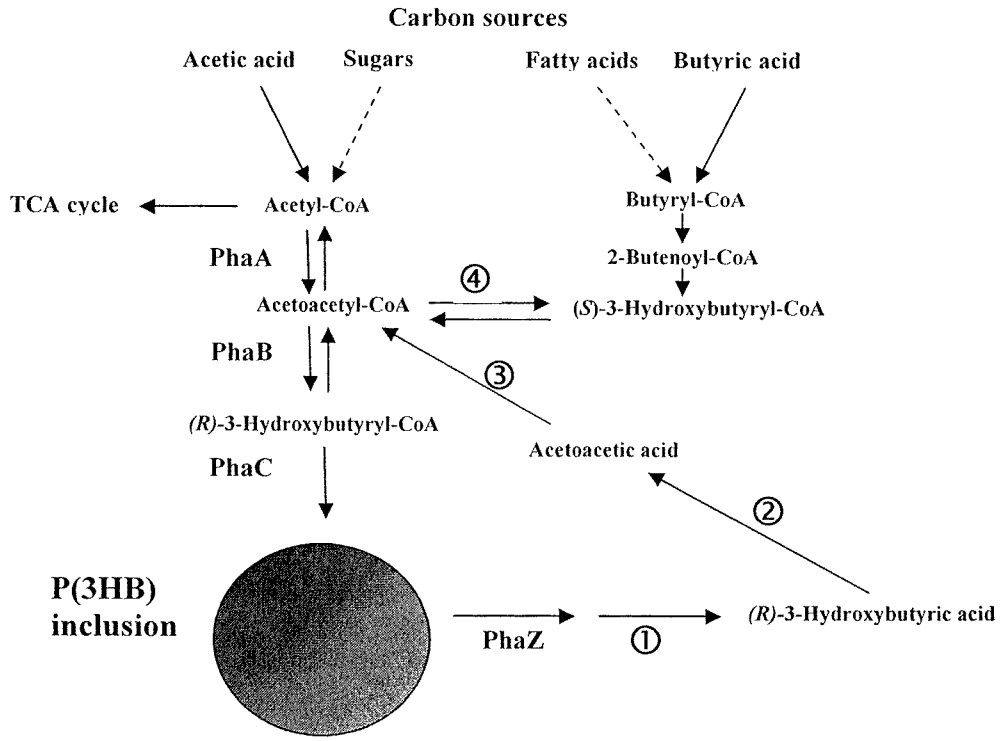
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของพอลิเมอร์

Polymer	Melting point (°C)	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation to break (%)	Glass transition temperature (°C)
P(3HB)	179	3.5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol% 3HV	170	2.9	38	-	-
9 mol% 3HV	162	1.9	37	-	-
14 mol% 3HV	150	1.5	35	-	-
20 mol% 3HV	145	1.2	32	-	-
25 mol% 3HV	137	0.7	30	-	-
P(3HB-co-4HB)					
3 mol% 4HB	166	-	28	45	-
10 mol% 4HB	159	-	24	242	-
16 mol% 4HB	-	-	26	444	-
64 mol% 4HB	50	30	17	591	-
90 mol% 4HB	50	100	65	1080	-
P(4HB)	53	149	104	1000	-
P(3HHx-co-3HO)	61	-	10	300	-
P(3HB)-co-6mol% 3HA	133	0.2	17	680	-8
P(3HB)-co-67mol% HP	44	-	-	-	-19
P(3HB)-co-3HHx	52	-	20	850	-4
Polypropylene	170	1.7	34.5	400	45

ที่มา : Khanna และ Srivastava (2005)

2.4 กระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์

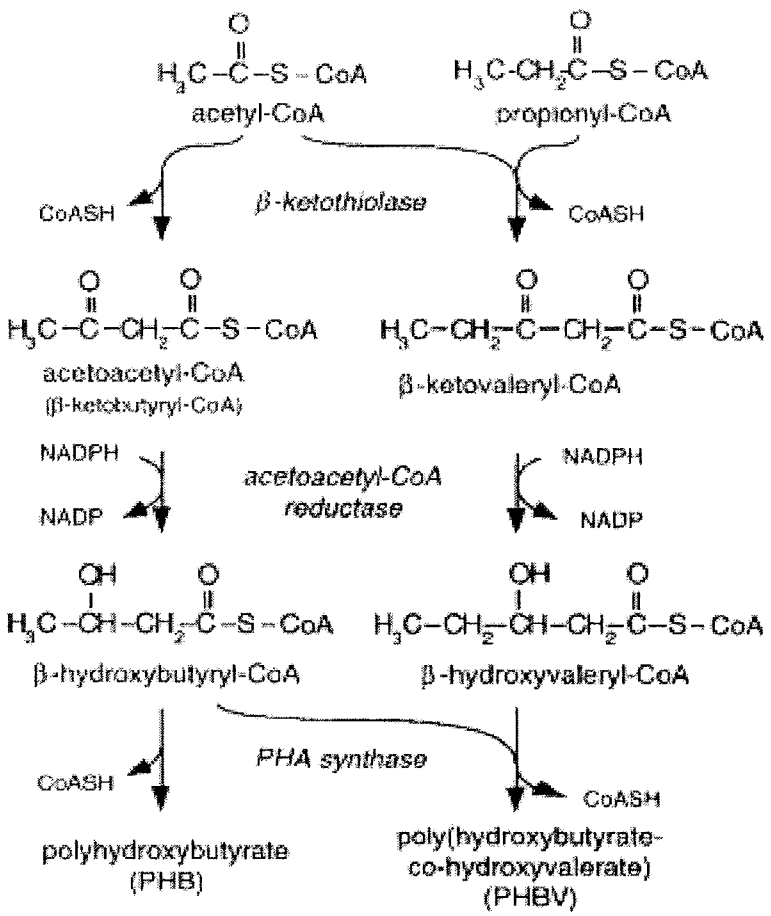
วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ดังแสดงในภาพที่ 3 มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางที่จะเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยเริ่มต้นจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ เปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ ด้วยการทำงานของเอนไซม์ เบต้า – คีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) และอะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-coA reductase) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) ไฮดรอกซีบิวทิริล-โคเอนไซม์เอ ไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthase อย่างไรก็ตาม PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่ม PHA depolymerase (Sudesh *et al.*, 2000) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ของแต่ละขั้นตอนในการสังเคราะห์ PHB นั้นเกิดจากการแสดงออกของ *pha*CBA cluster (Reddy *et al.*, 2003)



ภาพที่ 3 วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและการย่อยสลายในแบคทีเรีย
ที่มา : Sudesh และคณะ (2000)

*pha*CBA cluster ประกอบด้วย *pha*A, *pha*B และ *pha*C โดย *pha*A เป็นส่วนที่ควบคุมสำหรับการผลิตเอนไซม์ β-ketothiolase โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลง acetyl-coA ไปเป็น acetoacetyl-coA สำหรับ *pha*B เป็นส่วนที่ควบคุมการผลิตหรือสร้างเอนไซม์ NADPH-oxidoreductase ซึ่งทำการเปลี่ยน acetoacetyl-coA ให้เป็น R-3-hydroxybutyryl-coA และสำหรับ *pha*C เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ PHA polymerase โดยทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์จาก R-3-hydroxybutyryl-coA ส่วน *pha*P ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัว ของ PHA granule นั้นคือโปรตีน phasin ซึ่งโปรตีนมวลโมเลกุลต่ำ มีหน้าที่ส่งเสริมการผลิต การจับกับแกรนูลเพื่อทำการควบคุมขนาด จำนวน และพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต อย่างไรก็ตามการควบคุมขนาดและจำนวนของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตยังขึ้นกับปริมาณของ *pha*C ที่มีอยู่ในเซลล์อีกด้วย และยังมี *pha*Z ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (depolymerase) เพื่อใช้ปลดปล่อยมอนอเมอร์ออกจากพอลิเมอร์ โดย เอนไซม์ที่ *pha*Z ผลิตออกมาจะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานได้ด้วย PHB และสารกระตุ้น เช่น ทริปซิน จึงตั้งข้อสังเกตว่า *pha*Z อาจจะทำหน้าที่เป็นโปรเอนไซม์ (proenzyme) หรือการสลายแกรนูลของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยดีพอลิเมอร์เรสต้องอาศัยเอนไซม์ proteolytic enzyme อื่นร่วมด้วย (Luengo *et al.*, 2003)

สำหรับกระบวนการเกิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคพอลิเมอร์ไฮดรอกซีวาลีเรต แสดงดังภาพที่ 4 ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ด้วยการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ เช่นการเติมกรดโพรพิโอนิก กรดวาลิริก หรือกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้นๆ ที่มีจำนวนคาร์บอนเลขคี่เพื่อผลิตสารตัวกลางที่สำคัญคือโพรพิโอนิลโค-เอ (propionyl-CoA) ในอาหารกลูโคส กระบวนการเกิดโพรพิโอนิลโค-เอ ต้องอาศัยกลุ่มเอนไซม์หลายชนิด เช่น α-ketoacid oxidative dehydrogenase complex (BCKD), α-ketoglutarate dehydrogenase complex (KGD) และ pyruvate dehydrogenase complex (PD) (Eschenlauer *et al.*, 1996)



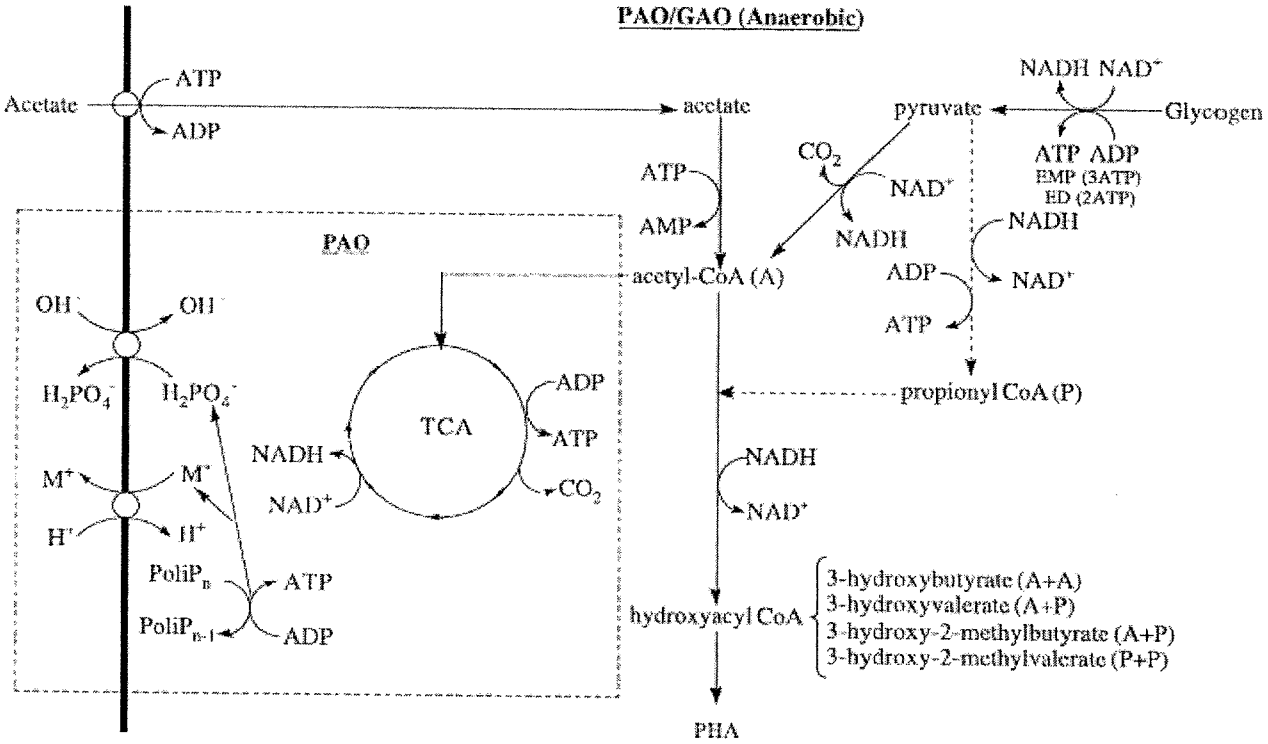
ภาพที่ 4 วิถีความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ PHB และ PHBV

ที่มา : Eschenlauer และคณะ (1996)

2.5 กระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์

PHA สามารถผลิตได้ในกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ กลุ่มจุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต (polyphosphate-accumulating organisms; PAOs) และกลุ่มจุลินทรีย์ที่สะสมไกลโคเจน (glycogen-accumulating organisms; GAOs) โดยเฉพาะในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ-ให้อากาศ จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต (PAOs) ได้แก่ *Accumulibacter phosphatis* (Wikipedia, 2008), *Rhodocyclus* spp., *Propionibacter pelophilus* (Crocetti *et al.*, 2000), *Acinetobacter baumannii* (Jorgensen and Pauli, 1995) จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมไกลโคเจน (GAOs) ได้แก่ *Acidobacteria* subphylum (Crocetti *et al.*, 2002), *Defluviicoccus vanus* (Dai *et al.*, 2007) ในสภาวะไร้อากาศ จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต จะใช้พอลิฟอสเฟตเป็นแหล่งพลังงานและไกลโคเจนภายในเซลล์เป็นแหล่งรีดิวซิงให้อิเล็กตรอน ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมไกลโคเจนจะใช้ไกลโคเจนภายในเซลล์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งรีดิวซิงให้อิเล็กตรอนในการรับสารอินทรีย์ โดยเฉพาะ

กรดไขมันระเหยง่ายมาเก็บสะสมไว้ในรูปของ PHA จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถใช้อะซิเตท และกระตุ้นให้เกิด acetyl-CoA เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ PHA ดังภาพที่ 5 (Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004)



ภาพที่ 5 กระบวนการสังเคราะห์ PHA ในระบบ PAO/GAO ภายใต้สภาวะไร้อากาศ
ที่มา : Salehizadeh และ Van Loosdrecht (2004)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์

การผลิตพอลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้นจะต้องคำนึงถึงหลายๆ ปัจจัยที่จะมีผลต่อชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ปัจจัยสำคัญต่อการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีดังนี้

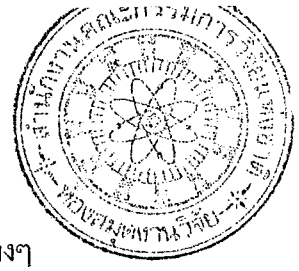
2.6.1 ชนิดของจุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตส่งผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย กล่าวคือจุลินทรีย์บางสายพันธุ์อาจผลิตพอลิเมอร์ในรูปโฮโมพอลิเมอร์ ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิตพอลิเมอร์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ เช่น เมื่อใช้

ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่ *Alcaligenes eutrophus* R3 พบว่ามีการผลิตพอลิเมอร์ในรูปโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) แต่เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนเดิมให้แก่ *A. eutrophus* ATCC17697 พบว่ามีการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (Anderson and Wynn, 1995)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่า จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ในปริมาณและองค์ประกอบที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 และในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์ โดยการ over expression ของ ยีน *Pha* ชนิดต่างๆ เช่น recombinant *E.coli* จากการตัดต่อยีน *PhaC* ของ *Pseudomonas* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต mcl-PHA synthase เพื่อเกิดการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลาง เป็นต้น (Suriyamongkol *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังได้มีงานวิจัยที่ใช้กลุ่มจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ปิวรา บุตรวงศ์, 2546; Dionisi *et al.*, 2005; Kasemsap and Wantawin, 2007) พบว่า การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของกลุ่มจุลินทรีย์มักเกิดในกระบวนการแอนแอโรบิก-แอโรบิก ของระบบบำบัดน้ำเสีย Alias และ Tan (2005) แยกเชื้อจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่า สามารถแยกเชื้อได้ 45 ไอโซเลท แต่มีเพียง 10 ไอโซเลทที่สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยไอโซเลท FLP1 สามาถเจริญได้ดีและใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เมื่อนำไปบ่งชี้โดยวิธี BIOLOG พบว่าสามารถจำแนกได้ว่าเป็น *Burkholderia cepacia*

Achromobacter xylosoxidans เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ *Achromobacter xylosoxidans* เดิมอยู่ในจีนัส *Alcaligenes* แต่ปัจจุบันได้จัดใหม่เป็นจีนัส *Achromobacter* โดย *Achromobacter xylosoxidans* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้อากาศในการเจริญ สามารถเคลื่อนที่ได้ มีจำนวนแฟลกเจลลา 1-9 อันต่อเซลล์ แกรมลบ มีรูปร่างแบบแท่งตรง สามารถใช้และเจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคส ไซโลส และซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้ไซโลสในการสร้างกรดได้ดี แต่สามารถสร้างกรดจากกลูโคส กาแลคโตส แมนโนส และอะราบิโนสได้น้อย ให้ผลเป็นบวกกับ indophenol oxidase และ catalase ให้ผลเป็นลบกับ urease, gelatinase และ deoxyribonuclease ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (Yabuuchi and Yano, 1981) *Achromobacter xylosoxidans* พบโดยทั่วไปในระบบตะกอนเร่ง และสามารถผลิต PHA ไว้ภายในเซลล์ได้ประมาณ 18-23% เมื่อใช้กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (Renner *et al.* 1996)



ตารางที่ 3 การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	สารอาหารตั้งต้น	PHA (g/l)	PHA (%w/w)	องค์ประกอบของ PHA (%โมล)		อ้างอิง
				HB	HV	
Alcaligenes eutrophus	น้ำเสียโรงงานแป้ง	1.2	34	NR	38	Yu (2001)
Azotobacter chroococcum H23	อาหารสังเคราะห์ (น้ำเสียจาก olive oil mill 60% + ammonium acetate 0.12%+valerate 40 mM)	4.7	88	NR	24	Pozo *et al.* (2002)
A. latus DSM1122	Soya waste	NR	NR	100	0	Wang *et al.* (2007)
Staphylococcus spp.	Soya waste	NR	NR	100	0	
Klebsiella spp.	Soya waste	NR	NR	79	21	
Cupriavidus nrcator H16	Crude palm oil 5 g/l	3. 5	75	100	0	Lee *et al.* (2008)
	Crude palm oil 5 g/l + propionate 5 g/l	NR	74	97	3	
	Crude palm oil 5 g/l + valerate 5 g/l	NR	64	94	6	
Pseudomonas hydrogenovora	Hydrolyzed whey permeate	1.44	12	79	21	Koller *et al.* (2008)
Rhodobacter sphaeroides 14F	Fructose 20 g/l + Glutamate 9 g/l	3.5	60	> 97	< 3	Lorrungruang *et al.* (2006)
Ralstonia eutropha	Acid from palm oil fiber fermentation + Propionic 2.5 g/l + Butyric 6.5 g/l	2.6	58	82	18	ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550)
Activated sludge	Acetate 0.6 g/l	NR	51	NR	NR	Kasemsap and Wantawin (2007)

NR = not reported

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
วันที่ 21 มิ.ย. 2553
227113

2.6.2 แหล่งคาร์บอน

ในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้และใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยที่แหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่แบคทีเรียนำมาใช้สังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีหลายชนิดได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส กรดซิตริก อะซิเตท โพรพิโอเนต บิวทิเรต แลคเตท เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำเสียซึ่งเป็นวัตถุดิบได้หลายชนิด (ตารางที่ 3) คาร์บอนแต่ละชนิดที่ใช้มีผลต่อองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้ ดังนั้นในการผลิตจึงต้องศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จากงานวิจัยของ Lemos และคณะ (2006) ศึกษาการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่งระบบ SBR ในอาหารสังเคราะห์ เปรียบเทียบระหว่างการเติมอะซิเตทและโพรพิโอเนต (30 mMl) ในอาหารสังเคราะห์ พบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเลี้ยงโดยเติมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนให้โฮโมพอลิเมอร์ชนิด HB ส่วนกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงโดยเติมโพรพิโอเนตให้โคพอลิเมอร์ชนิด HB และ HV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนอะซิเตตร่วมกับโพรพิโอเนต จะได้โคพอลิเมอร์ คือ HB, HV และ HMV (hydroxyl-methylvalerate) แต่ผลผลิตและอัตราการผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากการใช้อะซิเตตเป็นสารอาหารจะสูงกว่าการใช้โพรพิโอเนต ทั้งนี้เนื่องจากอะซิเตตประกอบด้วยคาร์บอนสายสั้นกว่า ทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้โดยจุลินทรีย์

Kemavongse และคณะ (2007) ศึกษาการใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริกต่อการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 เพื่อผลิต PHA ในอาหาร GA (glutamate-acetate medium) พบว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ แบคทีเรียสามารถผลิต PHA ภายในเซลล์ได้เท่ากับ 1.88 กรัมต่อลิตร (77.7%) PHA ที่ได้มีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 80.9:19.1 (%โมล) ส่วนการใช้กรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต PHA ภายในเซลล์ได้ 1.93 กรัมต่อลิตร (77.4%) มีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 15.2:84.8 (%โมล) แสดงให้เห็นว่า การใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้เกิดการส่งเสริมการผลิต HV มากกว่าการใช้กรดโพรพิโอนิก

จากงานวิจัยของ Wang และคณะ (2007) ศึกษาองค์ประกอบของพอลิเมอร์ของเชื้อผสมจากตะกอนเร่งที่เลี้ยงในของเสียจากมอลท์ (malt waste) และ ของเสียจากถั่วเหลือง (soya waste) พบว่าองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้มีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 90:10 และ 75:25%โมล ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้พอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของ HB:HV เท่ากับ 55:45 และ 20:80 %โมล ตามลำดับ

จากงานวิจัยของ Doi และคณะ (1987 อ้างโดย Punrattanasin, 2001) ศึกษาการใช้ *Alcaligenes eutrophus*H16 ในอาหารที่ใช้อะซิเตรต อะซิเตรตร่วมกับโพรพิโอเนต และการใช้โพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆในช่วง 2-30 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน พบว่า การ

ใช้อะซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวจะได้ PHA ที่มี HB เป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว ขณะที่การใช้โพรพิโอเนตจะได้ PHA ที่มีทั้ง HB และ HV เป็นองค์ประกอบ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของโพรพิโอเนตจะทำให้มีสัดส่วนของ HV เพิ่มขึ้น โดยที่การใช้โพรพิโอเนตเพียงชนิดเดียวความเข้มข้น 18 กรัมต่อลิตร จะทำให้มีการสะสม PHA ในเซลล์มากที่สุด (56%) และมีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 73:27

2.6.3 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เคซีน เปบโตน และยีสต์สกัด รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) ต่างๆ จุลินทรีย์จะสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัด กล่าวคืออัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับไนโตรเจนมีค่าสูง อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ไม่ต้องจำกัดปริมาณสารอาหารในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและสามารถเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์ในระหว่างการเติบโต ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ผ่านการตัดแต่งยีนทางพันธุกรรม (Lee, 1996)

Grothe และคณะ (1999) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร (โมลคาร์บอนต่อโมลไนโตรเจน เท่ากับ 28.3) มีผลให้มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 4.6 กรัมต่อลิตร จากงานวิจัยของ Kumar และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากกลุ่มจุลินทรีย์ระบบตะกอนเร่งโรงงานผลิตอาหาร ความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24, 96, 120, 144 และ 168 (โมล/โมล) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ชุดที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 144 มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุด เท่ากับ 33% เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2007) ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 (โมล/โมล) เมื่อใช้ตะกอนสลัดจ์ในระบบ SBR และใช้บิวทิริกและวาเรอริคเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นกรดเริ่มต้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 100 ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมากที่สุด ผลผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 30.3 กรัมต่อกรัมเซลล์

2.6.4 แหล่งฟอสฟอรัสและอาหารเสริมเกลือแร่

จุลินทรีย์จะสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอแต่มีปริมาณฟอสฟอรัสและธาตุอาหารรองค่อนข้างจำกัด Grothe และคณะ

(1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่มีการเติมธาตุอาหารรอง ต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Alcaligenes latus* เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเติมธาตุอาหารรอง ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $NiSO_4$, $CaCl_2$, H_3BO_3, Na_2MoO_4, $CoCl_2$, $MnCl_2$ และ Ammonium Fe (III) citrate มีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงขึ้นเป็น 6.8 และ 3.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Ryu และคณะ (1997) ได้ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีปริมาณฟอสเฟตจำกัด มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.8 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริก อุณหภูมิในการหมัก 34 องศาเซลเซียส มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นเริ่มต้น KH_2PO_4 เท่ากับ 2.2, 3.1, 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นสามารถผลิตเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้นของเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงที่สุด เท่ากับ 281 และ 232 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายใน 74 ชั่วโมง จากการทดลองของธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มซึ่งมีฟอสเฟตอยู่ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติม KH_2PO_4 เพิ่มเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 ไม่ได้ช่วยส่งเสริมให้เกิดการสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเพิ่มขึ้น

2.6.5 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เนื่องจากสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทสและไอโอซิเตรทดีไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิติลโคเอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (Luengo *et al.*, 2003) จากการศึกษาของ Satoh และคณะ (1998) เลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบตะกอนเร่ง 2 แบบ Anaerobic – Aerobic (AA) และ Microanaerobic – Aerobic (MA) แล้วนำสลัดจ์จากทั้ง 2 ระบบมาทดสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในถังปฏิกรณ์แบบกะ 2 แบบ คือ ไม่มีการเติมออกซิเจน และแบบที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่าสลัดจ์จากระบบ AA มีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เท่ากับ 33% และ 22% ตามลำดับ ส่วนในสลัดจ์จากระบบ MA สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ถึง 62% และจากการทดลองของธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 พบว่าการให้อากาศที่ 2 vvm ทำให้เกิดการเจริญของจุลินทรีย์สูงกว่า แต่มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยกว่าที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm

2.6.6 พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าหากต้องการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตควรทำการควบคุมพีเอชไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไป (Kinoshita *et al.*, 1991) ในสภาวะที่พีเอชต่ำจะขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไอออนของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ ส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารและเซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเป็นพิษเนื่องจากมีปริมาณกรดในระบบมากเกินไป (Luli and Strohl, 1990) การปรับพีเอชเป็น 7 เป็นการปรับปริมาณไฮโดรเจนอิสระที่แสดงประจุเป็นบวกให้ลดลงด้วยไฮดรอกไซด์ซึ่งมีประจุเป็นลบ ทำให้ไฮโดรเจนไอออนไม่สามารถส่งผลกระทบโดยตรงต่อเซลล์ (Du *et al.*, 2001) จากรายงานของ Kasemsap และ Wantawin (2007) ศึกษาผลของพีเอชต่อศักยภาพในการสังเคราะห์ PHA โดยใช้ชุดทดลองในสภาวะไร้อากาศและใช้กรดอะซิติกเป็นสารอาหาร เปรียบเทียบการสะสม PHA จากสลัดจ์ส่วนเกิน 2 กลุ่ม คือ RP5 และ RP15 ที่มีปริมาณพอลิฟอสเฟตในเซลล์เท่ากับ 2% และ 6% ตามลำดับ, ปริมาณไกลโคเจนภายในเซลล์เท่ากับ 12% และ 15% ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าการสลายสารที่เป็นแหล่งพลังงานได้แก่ไกลโคเจนและพอลิฟอสเฟตที่ค่าพีเอช 6 จะน้อยที่สุด และมากขึ้นตามลำดับเมื่อพีเอชสูงขึ้น มีผลทำให้มีการสะสม PHA ที่พีเอช 6 มากที่สุด คือ 17% และ 29% สำหรับ RP5 และ RP15 ตามลำดับ แต่การใช้พลังงานมากขึ้นและเป็นพลังงานจากการสลายไกลโคเจนในการดึงสารอาหารเข้าเซลล์ที่พีเอชสูงขึ้นมีผลให้สัดส่วน HV ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของพลาสติกประเภทนี้มีค่าสูงขึ้น ดังนั้นสลัดจ์ RP5 จะมีสัดส่วน HV/PHA ที่พีเอช 8 สูงกว่าที่สะสมที่พีเอช 6 แต่สัดส่วนดังกล่าวค่อนข้างคงที่สำหรับ RP15

2.6.7 อุณหภูมิ

Aslim และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลคติก พบว่าอุณหภูมิที่จีนัส *Lactobacillus* สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ในขณะที่จีนัส *Pediococcus* เจริญได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ *Streptococcus* เจริญได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่โสภา ชินเวชกิจวานิชย์ (2547) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสีย อุณหภูมิที่ใช้ทดลองได้แก่ 10, 20, และ 30 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิส่งผลต่ออัตราการผลิตและผลผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต อย่างเห็นได้ชัด คืออัตราการผลิตและผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ โดยชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กับการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะไนโตรเจน มีค่าสัดส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 40% โดยค่าความเข้มข้นของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในระบบ คือ 2,830 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองการจำกัดธาตุ

อาหารเฉพาะฟอสฟอรัส ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีค่าสัดส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 52% ค่าความเข้มข้นของระบบ คือ 1,491 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในการทดลองที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน โดยค่าสัดส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 45% และความเข้มข้นของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเท่ากับ 2,133 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.7 การสกัด PHA และทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนปกติประกอบด้วยการแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นนำเซลล์จุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมได้ไปเข้ากระบวนการย่อยเซลล์เพื่อทำให้เซลล์แตกออกและปลดปล่อย PHA ที่สะสมไว้หลุดออกมา หลังจากแยกเอากากชีวมวลออกจึงส่งเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ในขั้นตอนการแยกเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักใช้วิธีการแยกเซลล์ตามปกติธรรมดาซึ่งมักอาศัยกระบวนการแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหรืออาศัยเพียงการกรองก็สามารถแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักได้ สำหรับในขั้นตอนต่อไปเป็นการย่อยให้เซลล์แตกเพื่อแยกเอา PHA ที่อยู่ภายในออกมา สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

- การย่อยเซลล์ และสกัด PHA ออกด้วยตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม (chloroform) เมทธิลีนคลอไรด์ (methylene chloride) โพรพิลีนคาร์บอเนต (propylene carbonate) และไดคลอโรอีเทน (dichloroethane) แต่กระบวนการสกัด PHA ออกด้วยตัวทำละลายนี้ จะได้สารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้นประมาณ 5%ของน้ำหนักต่อปริมาตรของ PHA ซึ่งมีความหนืดสูงมาก ทำให้กระบวนการแยกเศษชีวมวลออกไปทำได้ยาก จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากจนให้ผลไม่คุ้มค่ากับการลงทุนถึงแม้จะมีการหมุนเวียนนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ (Lee, 1996)

- การย่อยเศษชีวมวลที่ไม่ใช่ PHA ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย วิธีนี้จะช่วยย่อยสลายเศษชีวมวลออกไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือโซเดียมไฮโปคลอไรท์จะไปย่อยสลายสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยเช่นกัน และนอกจากนี้ยังมีผลทำให้ PHA ที่แยกสกัดได้มีคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้งานหลายๆ ด้าน

- การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เอนไซม์ กระบวนการนี้ประกอบด้วยการให้ความร้อนกับชีวมวลแล้วนำไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ จากนั้นนำไปล้างด้วยสารละลายซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ เพื่อละลายเอาเศษชีวมวลออกจาก PHA แต่ผลที่ได้จากกระบวนการนี้มักจะมีความบริสุทธิ์ที่ไม่สูงนัก ในกรณีที่ต้องความบริสุทธิ์สูงๆ ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการแยกสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูงขึ้น (Hocking and Marchessault, 1992)