# บทที่ 1

# บทนำ

ในปัจจุบันได้มีการใช้พลาสติกเพื่อเป็นภาชนะบรรจุหีบห่อและสิ่งของเครื่องใช้ต่าง ๆ และในอนาคตก็มีแนวโน้มที่จะใช้พลาสติกแทนวัสดุอื่นๆ มากขึ้นอีก พลาสติกเหล่านี้ได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น โพลีโพรพิลีน (polypropylene) หรือ PP โพลีเอทธิลีน (polyethylene) หรือ PE โพลีไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride) หรือ PVC พลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีนี้ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติ หลังจากการใช้พลาสติกเหล่านี้จะก่อให้เกิดปัญหากับระบบนิเวศน์ นั่นคือปัญหาขยะเศษพลาสติกที่ถูกทิ้งกระจัดกระจายตามที่ต่างๆเป็นปริมาณมากและปัญหาเกี่ยวกับการกำจัดพลาสติกเหล่านี้ (Evans และ Sikdar, 1990) วิธีการกำจัดพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในปัจจุบันได้แก่ การฝังดิน การเผา(incineration)และการนำกลับมาใช้ใหม่(recycling) ซึ่งเหล่านี้เป็นวิธีที่ไม่สามารถช่วยแก้ปัญหาได้ในระยะยาว การกำจัดโดยการฝังดินส่งผลให้ในอนาคตเกิดปัญหาไม่สามารถหาพื้นที่รองรับขยะที่มีปริมาณมากขึ้น การกำจัดโดยการเผานับว่าเป็นวิธีที่มีอันตรายและเสียค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากในระหว่างการเผาพลาสติกจะเกิดก๊าซพิษ เช่น การเผาพลาสติกไนล่อนจะได้ก๊าซไฮโดรเจนไซยาไนด์ และการเผาพลาสติกพีวีซีจะให้ก๊าซไฮโดรเจนคลอไรด์ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรด(Huffman และKeller,1973) ก๊าซพิษเหล่านี้ต้องอาศัยเครื่องมือกำจัดที่ต้องใช้พลังงานสูงและมีปัญหาไม่สามารถควบคุมควันหรือเขม่าที่เกิดจากการเผาได้อย่างมีประสิทธิภาพ การนำกลับมาใช้ใหม่มีข้อเสียคือทำให้คุณภาพของพลาสติกลดลง เนื่องจากปัญหาการแยกขยะพลาสติกชนิดต่างๆออกจากกันและการแยกสารเติมแต่ง(additives) ต่างๆ ออกจากพลาสติกนั้นทำได้ยาก เช่น เม็ดสี (pigments) สารเคลือบ (coatings) สารเพิ่มความแข็ง(reinforcement) ขั้นตอนเหล่านี้จะทำให้พลาสติกที่นำกลับมาใช้ใหม่มีราคาสูงกว่าพลาสติกที่ผลิตขึ้นใหม่ นอกจากนี้กระบวนการที่ใช้ในการนำกลับมาใช้ใหม่จะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพลาสติกทำให้พลาสติกที่ได้มีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้งาน (Leaversuch,1987) ในบางประเทศได้ออกกฎหมายห้ามใช้พลาสติกที่ไม่ย่อยสลายสำหรับการบรรจุอาหารและเครื่องดื่มบางประเภท เช่น อิตาลี เดนมาร์ก นอร์เวย์ และอังกฤษ(Evans และ Sikdar,1990)และมีความพยายามทางกฎหมายเพิ่มขึ้นเพื่อประกาศห้ามการทิ้งสิ่งของที่ทำมาจาก

พลาสติกชนิดที่ไม่ย่อยสลาย ขยะพลาสติกที่ถูกทิ้งอยู่ตามที่ต่างๆ ทั่วโลกได้กลายเป็นปัญหาใหญ่ เพราะความคงทนและไม่ย่อยสลายนั่นเอง ในแต่ละปีพบว่ามีขยะพลาสติกถูกทิ้งและทับถมในทะเล มหาสมุทร ในปริมาณสูงถึงแสนๆ ตัน ขยะนี้ทำให้สัตว์ทะเลตายในแต่ละปีนับล้านตัว สัตว์จะตายเนื่องจากหายใจไม่ออกเพราะกินพลาสติกเข้าไปโดยเข้าใจผิดว่าเป็นอาหาร หรือติดอยู่ในพลาสติกนั้นและไม่สามารถออกมาได้ (Leaversuch, 1987; Pruter, 1987 และ Wilber, 1987) จากปัญหาและอันตรายต่อสภาพแวดล้อมที่เกิดจากพลาสติกที่ไม่ย่อยสลายนี้เอง ทำให้เกิดการตื่นตัวและผลักดันให้อุตสาหกรรมพลาสติกทำการค้นคว้าและวิจัย เพื่อผลิตพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้เพื่อเป็นทางเลือกใหม่และช่วยบรรเทาปัญหาที่เกิดขึ้นกับระบบนิเวศน์

พลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้ในปัจจุบันมี 3 ชนิดคือ

1 พลาสติกที่ถูกสลายตัวโดยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีหมู่คาร์บอนิล (c=o) ซึ่งมีความไวสูงต่อ UV ทำให้เกิดการแตกตัวในสายโซ่ของโพลีเมอร์ พลาสติกจะกรอบและแตกได้ หรือมีการเติมสารแต่งเติมชนิดที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำลายสายโพลีเมอร์ (photoactivator) เมื่อได้รับ UV เช่น เหล็ก และ ทองแดง

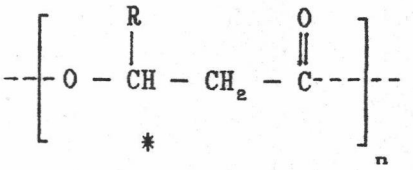
2 พลาสติกที่มีการเติมสารแต่งเติมชนิดที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น แป้ง ข้าว ข้าวโพด ลงในพลาสติก เช่น โพลีเอทธิลีน โพลีโพรพิลีน โพลีสไตรีน เป็นต้น เมื่ออนุภาคของแป้งถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ พลาสติกจะอ่อนตัวลงมีความพรุนและมีพื้นที่ผิวมากขึ้นช่วยในการทำลายร่างแหของพลาสติก

3 พลาสติกชนิดเทอร์โมโพลีเอสเทอร์ที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ เทอร์โมโพลีเอสเทอร์นี้ถูกสร้างและสะสมได้ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด และจัดอยู่ในสารที่เรียกว่าโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoates) หรือ PHA PHA มีคุณสมบัติของเทอร์โมพลาสติกคือสามารถนำมาขึ้นรูปและทำให้เป็นฟิล์ม แผ่น ไฟเบอร์ได้ พลาสติกกลุ่มนี้ยังสามารถย่อยสลายโดยสมบูรณ์ในธรรมชาติ (biodegradable thermoplastic) (Evans และ Sikdar, 1990; Brandl และคณะ, 1990)

PHA เป็นโพลีเอสเทอร์ที่จุลินทรีย์บางชนิดสร้างและสะสมภายในแกรนูล เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนซึ่งเปรียบเทียบได้กับ ไกลโคเจนที่สะสมในสัตว์ชั้นสูง หรือแป้งที่สะสมในพืช (Bloembergen และคณะ, 1986) PHA มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับคุณสมบัติของ PP และ PE และยังสามารถนำมาขึ้นรูปได้ (Holmes, 1989) PHA มีข้อดีกว่า PP และ PE คือ

สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) และดีโพลีเมอเรส (depolymerases) ผลจากการย่อยสลายได้สารที่ไม่มีอันตราย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evans และSikdar, 1990) นอกจากนี้ PHA ยังมีสมบัติที่เข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้

PHA เป็นโพลีเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มกรดไฮดรอกซี ที่เชื่อมต่อกันโดยพันธะเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นระหว่าง หมู่คาร์บอกซิลิก จากโมโนเมอร์ตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีจากโมโนเมอร์อีกตัวหนึ่ง เบต้า-คาร์บอนเป็นไครัลคาร์บอน ซึ่งทุกๆ โมโนเมอร์แสดง R-configuration และการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์เป็นแบบ หัวต่อหาง (isotactic) เช่นเดียวกับ PP



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของโมโนเมอร์ ของ PHA (---) พันธะเอสเทอร์ และ * คือเบต้า-คาร์บอน (Brandl และคณะ, 1990)

จากรูปที่ 1 เมื่อ R คือหมู่เมทธิล โมโนเมอร์ นี้คือ β-hydroxybutyrate หรือ 3HB
เมื่อ R คือหมู่เอทธิล โมโนเมอร์ นี้คือ β-hydroxyvalerate หรือ 3HV
เมื่อ R คือหมู่โพรพิล โมโนเมอร์ นี้คือ β-hydroxycaproate หรือ 3HC
เมื่อ R คือหมู่บิวทิล โมโนเมอร์ นี้คือ β-hydroxyheptanoate หรือ 3HH
เมื่อ R คือหมู่เพนทิล โมโนเมอร์ นี้คือ β-hydroxyoctanoate หรือ 3HO
เมื่อ R คือหมู่เฮกซิล โมโนเมอร์ นี้คือ β-hydroxynonanoate หรือ 3HN
เมื่อ R คือหมู่เฮปทิล โมโนเมอร์ นี้คือ β-hydroxydecanoate หรือ 3HD
เมื่อ R คือหมู่ออกทิล โมโนเมอร์ นี้คือ β-hydroxyundecanoate หรือ 3HUD
เมื่อ R คือหมู่โนนิล โมโนเมอร์ นี้คือ β-hydroxydodecanoate หรือ 3HDD

PHA ที่พบอาจแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ PHA ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียว เรียกว่าโฮโมโพลีเมอร์ (homopolymer) เช่น โพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทเรียกว่า poly(3-hydroxybutyrate) หรือ PHB นอกจากนี้ PHA ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิด หรือเฮทเทอร์โรโพลีเมอร์ (heteropolymer) เช่น

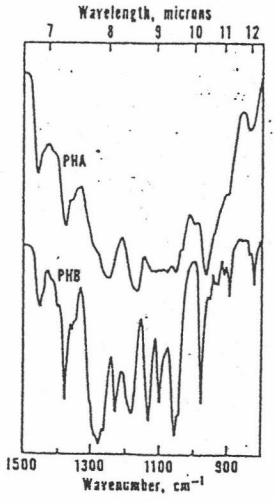
โคโพลีเมอร์ (copolymer) ได้แก่ P(3HB-co-3HV) และ P(3HB-co-4HB) และเทอร์โพลีเมอร์ (terpolymer) ได้แก่ P(3HB-3HV-4HB) เป็นต้น

การค้นพบ PHA

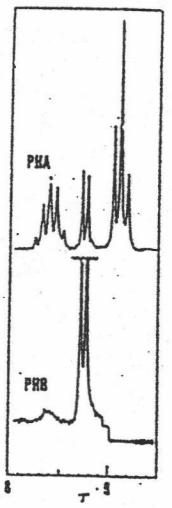
PHB เป็นสารตัวแรกในกลุ่มของ PHA ที่ถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 โดยนักจุลชีววิทยาชื่อ Lemoigne ซึ่งสกัดแยกได้จาก *Bacillus megaterium* กล่าวได้ว่า PHB เป็น PHA ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3HB เท่านั้น ต่อมาในปี 1974 Wallen และ Rohwedder ได้รายงานว่าพบเฮทเทอร์โรโพลีเมอร์ที่สกัดจากกากตะกอนบำบัดน้ำเสียมีองค์ประกอบหลักคือ 3HB และ 3HV โดยมี 3HC และ 3HH เป็นส่วนน้อย การพบโมโนเมอร์ชนิดอื่นๆ นอกจาก 3HB นี้เองทำให้ Wallen และ Rohwedder เสนอให้เรียกสารกลุ่มนี้ว่า PHA Wallen และ Rohwedder ได้รายงานสมบัติของเฮทเทอร์โรโพลีเมอร์ซึ่งแตกต่างจาก PHB คือเฮทเทอร์โรโพลีเมอร์นี้มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า PHB และสามารถละลายได้ในเอทธานอลร้อนซึ่งต่างจาก PHB (ตารางที่ 1) นอกจากนี้สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometry และ NMR spectroscopy ของ PHB และ PHA ก็แตกต่างกันด้วย (รูปที่ 2) และ (รูปที่ 3)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของ PHA และ PHB (Wallen และ Rohwedder, 1974)

| PHA | PHB |
|---|---|
| ของแข็งสีขาว<br>ละลายในคลอโรฟอร์ม<br>ตกตะกอนได้ในอีเธอร์<br>จุดหลอมเหลวระหว่าง 97-100°ซ<br>ละลายในเอทธานอลร้อน<br>เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก<br>เป็นเฮทเทอร์โรโพลีเมอร์ ประกอบด้วยกรดไฮดรอกซีที่มีคาร์บอน 4 5 และ 6 อะตอม | ของแข็งสีขาว<br>ละลายในคลอโรฟอร์ม<br>ตกตะกอนได้ในอีเธอร์<br>จุดหลอมเหลวระหว่าง 160-180°ซ<br>ไม่ละลายในเอทธานอลร้อน<br>เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก<br>เป็นโฮโมโพลีเมอร์ ประกอบด้วยกรดไฮดรอกซีที่มีคาร์บอน 4 อะตอม |




รูปที่ 2 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometry ของ PHA และ PHB (Wallen และ Rohwedder,1974)



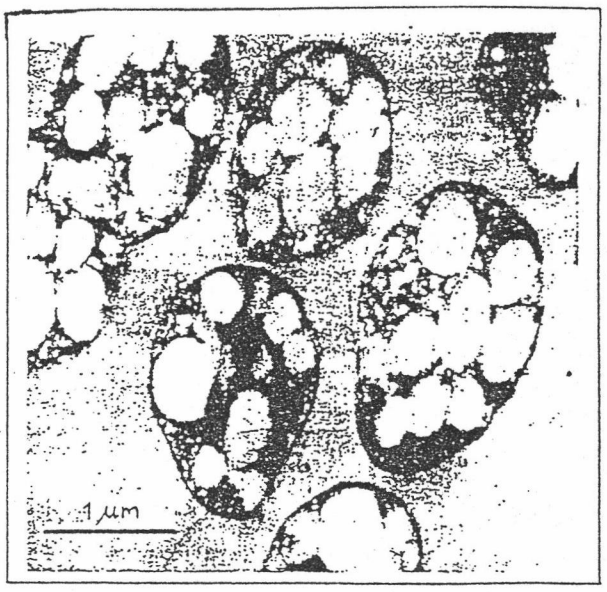

รูปที่ 3 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี NMR spectroscopy ของ PHA และ PHB (Wallen และ Rohwedder,1974)

Findlay และ White (1983) วิเคราะห์องค์ประกอบของโพลีเมอร์ที่สกัดจากตะกอนจากทะเล (marine sediments)โดยวิธีแคปพิลลารีแกสโครโมโตกราฟฟี โพลีเมอร์ประกอบด้วยโมโนเมอร์อย่างน้อย 11 ชนิดโดยมี 3HB และ 3HV เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังพบว่า *Bacillus megaterium* สามารถสร้างเฮทเทอโรโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3HB 3HH 3HO ปริมาณ 95 3 2 โมลเปอร์เซนต์ และโมโนเมอร์ชนิดอื่นๆ อีกเล็กน้อย ในปี 1986 Odham และคณะพบเฮทเทอโรโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วย HB HH และ HO ในกากตะกอน (sewage sludge) ในปี 1983 ได้มีรายงานที่สำคัญของ De Smet และคณะโดยพบว่า *Pseudomonas oleovorans* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีออกเทน (n-octane) เป็นแหล่งคาร์บอนและมีความเข้มข้น 50% โดยปริมาตร การศึกษาแกรนูลโดยวิธี freeze-fracture electron microscopy พบว่าเชื้อนี้สามารถสะสมแกรนูลที่มีลักษณะคล้ายกับแกรนูลของ PHB โพลิเมอร์ที่สกัดได้ประกอบด้วย 3HO และอื่นๆ เล็กน้อยแต่ไม่พบ 3HB ต่อมาในปี 1986 Lageveen และคณะได้รายงานที่สอดคล้องว่าเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas oleovorans* โดยใช้อัลเคนที่มีความยาวคาร์บอน 6 ถึง 12 คาร์บอนอะตอม โพลีเมอร์ที่สกัดได้ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีความยาวคาร์บอนอะตอมเท่ากับความยาวคาร์บอนอะตอมของสับสเตรทที่ใช้เลี้ยง และโมโนเมอร์ที่มีความยาวคาร์บอนอะตอมลดลง 2 คาร์บอน นอกจากนี้พบว่า *Pseudomonas oleovorans* ไม่สามารถสร้าง PHB แหล่งคาร์บอนที่เป็นทั้งอัลเคน หรือกลูโคส Brandl และคณะ (1990) ได้รายงานการพบ PHA ในจุลินทรีย์หลายสกุลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างกลุ่มและจีนัสของจุลินทรีย์ที่สะสม PHA (Brandl และคณะ, 1990)

| กลุ่ม/สกุลของจุลินทรีย์ | ปริมาณสูงสุดของ PHA ที่พบ (% ต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์) |
|---|---|
| Gram-negative aerobic rod and cocci | |
| *Alcaligenes* | 96 |
| *Azotobacter* | 73 |
| *Methylobacterium* | 47 |
| *Pseudomonas* | 67 |
| *Rhizobium* | 57 |
| Gram-negative facultative anaerobic rods | |
| *Chromobacterium* | 37 |
| Gram-negative anaerobic bacteria | |
| *Syntrophomonas* | 30 |
| Gram-positive cocci | |
| *Micrococcus* | 28 |
| Endospore-forming rods and cocci | |
| *Bacillus* | 25 |
| *Clostridium* | 13 |
| Sheathed bacteria | |
| *Sphaerotilus* | 45 |
| Phototrophic bacteria | |
| *Chromatium* | 20 |
| *Rhodobacter* | 80 |
| *Rhodospirillum* | 47 |
| Cyanobacteria | |
| *Chlorogloea* | 10 |
| *Spirulina* | 6 |

ในปี 1964 Lundgren Pfister และ Merrick ศึกษาลักษณะแกรนูลของ PHB พบว่าแกรนูลมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2 ถึง 0.5 ไมครอน และมีเมมเบรนที่ประกอบด้วยไลปิดและโปรตีนหนา 2 นาโนเมตร Byrom (1987) ได้แสดงภาพตัดของเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* ภายในเซลล์มีแกรนูลของ PHB (รูปที่ 4) Ballard และคณะ (1987) ได้ศึกษาถึงจำนวนและขนาดของแกรนูลใน *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสม PHB จำนวนแกรนูลต่อเซลล์จะอยู่ในช่วง 8 ถึง 12 แกรนูล และทำให้เซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มจาก 0.24 เป็น 0.50 ไมครอน รูปร่างของเซลล์เมื่อสะสม PHB จะเปลี่ยนเป็นค่อนข้างกลม และพบว่าการสะสม PHB จะหยุดเมื่อมีปริมาณ PHB ประมาณ 80 % ต่อน้ำหนักแห้ง ถึงแม้ว่ายังคงมีเอนไซม์และสับสเตรทที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ PHB ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องมาจากเซลล์ไม่สามารถเก็บ PHB ได้มากกว่านี้ภายใต้ปริมาณผนังเซลล์ที่จำกัดนั่นเอง ภายในแกรนูลจะเป็น PHB ประมาณ 98 % โดยน้ำหนัก โปรตีน 2 % โดยน้ำหนัก และที่เหลือเป็นไขมันจำพวกกรด Phosphatidic และสารประกอบที่ละลายในอะซิโตนปริมาณเล็กน้อย แกรนูล 1 อัน จะประกอบด้วยสายของ PHB อย่างน้อย 1,000 สาย น้ำหนักโมเลกุลของสาย PHB จะแตกต่างกันในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Alcaligenes eutrophus* อยู่ในช่วง $6 \times 10^5$ ถึง $1.2 \times 10^6$ *Azobacter sp.* อยู่ในช่วง $8 \times 10^5$ ถึง $2 \times 10^6$ *Pseudomonas sp.* $5 \times 10^4$ ถึง $6 \times 10^4$ *Methylobacterium sp.* $2.5 \times 10^5$ ถึง $3 \times 10^5$ นอกจากชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำให้น้ำหนักโมเลกุลต่างกันแล้ว วิธีการสกัด ช่วงการเจริญของเซลล์ที่นำมาสกัด และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อุณหภูมิ ปริมาณสารอาหารที่จำเป็นก็มีผลเช่นเดียวกัน (Dawes และ Senior, 1973 ; Ballard และคณะ, 1987 และ Berger และคณะ, 1989) และในปี 1994 Taidi และคณะ ได้ศึกษาผลของชนิดคาร์บอน และความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ที่ผลิตโดย *Methylobacterium extorquens* และ *Alcaligenes eutrophus* พบว่าสำหรับ *Methylobacterium extorquens* ถ้าให้ความเข้มข้นของคาร์บอนเริ่มต้นต่ำจะได้น้ำหนักโมเลกุลของ PHB สูง ซึ่งต่างจาก *Alcaligenes eutrophus* คือ ทั้งชนิดของคาร์บอน (ฟรุกโตส อะซิเตท กรดบิวทิริก) และความเข้มข้นเริ่มต้นไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ซึ่งมีค่าสูงอยู่แล้ว



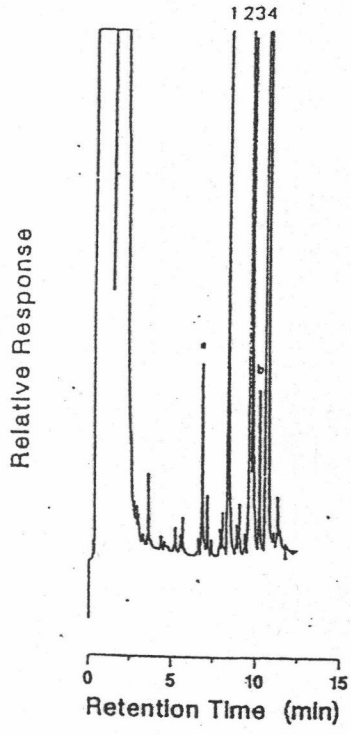

รูปที่ 4 ภาพตัดของเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดง PHB แกรนูลภายในเซลล์ (Byrom, 1987)

การหาปริมาณ และการวิเคราะห์ PHA

Lemoigne (1926) วัดปริมาณ PHB ภายในเซลล์ของ *Bacillus megaterium* โดยวิธี Gravimetric method ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายเฉพาะ PHB แต่ไม่ละลายไลปิดตัวอื่น ได้แก่ คลอโรฟอร์มต้มเดือด และตกตะกอน PHB กลับคืนโดยใช้เมทธานอล หรือ เอทธานอล อบตะกอนแห้งแล้วนำไปหาปริมาณ วิธีนี้จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่มี PHB มากในระดับมิลลิกรัม จึงจะได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำและวัดได้โดยสะดวก วิธีนี้จะวัดได้ยากถ้ามีตัวอย่างน้อยกว่า 1 มิลลิกรัม ต่อมาในปี 1958 Williamson และ Wilkinson ได้เสนอวิธีตรวจสอบได้รวดเร็ว และให้ความแม่นยำมากขึ้นในการวัดปริมาณ PHB โดยทำให้เซลล์แตกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ และวัดความขุ่นของไลปิดแกรนูล (PHB ที่อยู่ในแกรนูล) วิธีนี้มีข้อเสียคือต้องทำกราฟมาตราฐานทุกครั้งที่ใช้เซลล์ต่างชนิดกัน และค่าความขุ่นที่วัดได้จะเป็นค่าที่เกิดจาก PHB ที่อยู่ในไลปิดแกรนูลเท่านั้น PHB ที่หลุดออกมานอกแกรนูลแล้วไม่สามารถวัดได้ ในปี 1961 Law และ Slepecky ได้เสนอวิธีการวัดหาปริมาณ PHB โดยวิธี Spectrophotometry เพื่อความสะดวก และแม่นยำมากขึ้น วิธีนี้สามารถวัด PHB ที่มีปริมาณน้อยได้คือ 5 ถึง 50 ไมโครกรัม หลักการของวิธีนี้คือ PHB จะถูกไฮโดรไลซ์เป็นกรดโครโตนิก(crotonic acid)โดยความร้อนและกรดซัลฟูริกเข้มข้น วัดปริมาณของกรดโครโตนิกที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด เนื่องจากวิธีทาง spectrophotometry และอื่นๆ ที่กล่าวมาแล้วไม่สามารถบอกความแตกต่างของโมโนเมอร์ตัวอื่นกับ 3HB ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องใช้วิธีการอื่นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ และชนิด

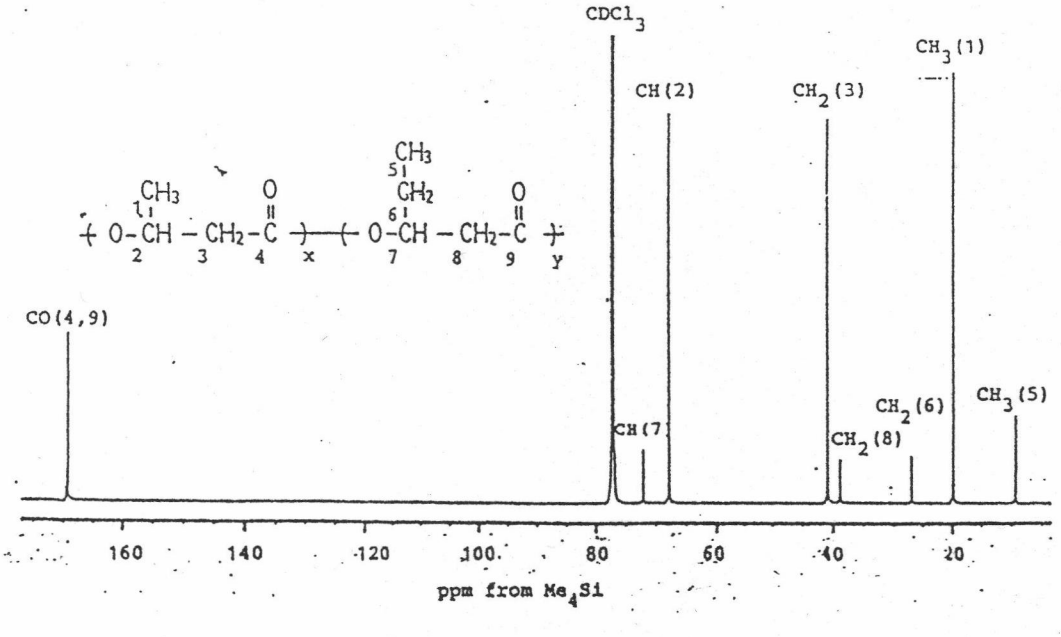
ของโมโนเมอร์ตัวอื่นของ PHA ที่ไม่ใช่ 3HB เช่น การวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) ในปี 1978 Braunegg Sonnleitner และ Lafferty ได้รายงานวิธีการหาปริมาณ PHB จากเซลล์ของ *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 วิธีการของ Braunegg และคณะ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนการสกัด PHB ออกจากเซลล์ที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยอะซิโตน ขั้นตอนต่อมาคือการเตรียมอนุพันธ์ของโพลีเมอร์โดยปฏิกิริยาเมทธาโนไลซิส (methanolysis) ซึ่งจะได้อนุพันธ์ของเมทธิลเอสเทอร์ของ 3HB อยู่ในชั้นคลอโรฟอร์ม การคำนวณหาปริมาณ PHB ทำโดยเปรียบเทียบกับ PHB มาตรฐาน วิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณ PHB ที่ความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ $10^{-5}$ กรัม/ลิตร Findlay และ White (1983) รายงานการวิเคราะห์ PHA จากตะกอนทะเล วิธีการของ Findlay และ White ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ การสกัดแยก PHA ออกจากตะกอน การทำ PHA ให้บริสุทธิ์ และการเตรียมอนุพันธ์ของ PHAโดยใช้กรดมาลิกเป็นสารมาตรฐานภายใน ในปี 1986 Odham และคณะได้เสนอการวิเคราะห์ PHA และกรดไขมันจากตะกอนบำบัดน้ำเสีย (sewage sludge) และแบคทีเรียจากทะเล วิธีการของ Odham ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ การสกัดไขมันออกจากตัวอย่างที่ผ่านการระเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ (freeze dry หรือ lyophilization) ต่อมาเป็นขั้นตอนการเตรียมให้เป็นกรดไขมันโดยใช้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ไม่รุนแรงในสภาวะด่าง (mild alkaline hydrolysis) และทำให้อยู่ในรูปไขมันอิสระโดยกรดซัลฟุริกเข้มข้น 25 % โดยปริมาตร และขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์เอสเทอร์ด้วยเพนตะฟลูออโรเบนซิลโบรไมด์(pentafluorobenzylbromide) นำมาวิเคราะห์โดย GC และวิธี Mass spectroscopy ต่อมาในปี 1988 Comeau Hall และ Odham ได้เสนอวิธีที่ปรับปรุงมาจาก 3 วิธีที่ได้กล่าวมาเพื่อวิเคราะห์ PHB และ PHV จากตัวอย่างตะกอนบำบัดน้ำเสีย (activated sludge) ขั้นตอนของวิธีการนี้ประกอบด้วยการเตรียมเซลล์ระเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ และขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในแล้วเก็บชั้นคลอโรฟอร์มที่มีอนุพันธ์ของ PHA ในรูป methyl ester ของโมโนเมอร์ชนิดต่างๆ นำไปวิเคราะห์ด้วย GC โดยมีก๊าซตัวพา (carrier gas)เป็นฮีเลียม อุณหภูมิของ injection port เท่ากับ 210° ซ อุณหภูมิของ detector port ชนิด flame ionization (FID) เท่ากับ 220° ซ และอุณหภูมิคอลัมน์เป็นโปรแกรมอุณหภูมิ วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ PHA เปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานที่เตรียมด้วยวิธีเดียวกัน ปริมาณที่น้อยที่สุดที่วัดได้คือ $10^{-5}$ กรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับวิธีของ Braunegg และคณะ วิธีนี้มีข้อได้เปรียบกว่า 3 วิธีที่กล่าวมาข้างต้นคือเป็นวิธีที่มีขั้นตอนน้อยและง่าย เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากไม่ยุ่งยากเหมือนวิธีของ Findlay

และ White หรือวิธีของ Odham และคณะ นอกจากนี้ยังสามารถแยกพีกอนุพันธ์ของ 3HV ออกจากพีกข้างเคียงได้ วิธีของ Braunegg และคณะมีปัญหาในขั้นตอนการทำแห้งของเซลล์ จะไม่มีประสิทธิภาพถ้าในตัวอย่างมีน้ำอยู่ Comeau และคณะ(1988) จึงปรับปรุงโดยการเตรียมเซลล์ระเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ และขั้นตอนการล้างกรดและกากเซลล์ในชั้นคลอโรฟอร์มออกเพื่อป้องกันการสลายตัวของสารที่เคลือบอยู่ในคอลัมน์ การใช้แคปพิลลารีคอลัมน์ช่วยเพิ่มความสามารถในการแยกพีกต่างๆ ออกจากกันได้ดียิ่งขึ้น ในการวิเคราะห์สารโดยวิธี GC นี้ สารมาตรฐานภายในมีความสำคัญ เพราะจะทำให้ผลวิเคราะห์มีความถูกต้องและเป็นผลที่สามารถทำซ้ำได้ (accuracy and reproducibility) เพราะสามารถลดความผิดพลาดที่อาจเกิดในขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์และปริมาตรที่ใช้ในการฉีดตัวอย่าง กรดเบนโซอิกมีความเหมาะสมในการที่จะนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน เพราะเมทธิลเอสเทอร์ของกรดเบนโซอิกจะออกจากคอลัมน์หลังจากพีกของเมทธิลเอสเทอร์ของ 3HB และ 3HV ดังแสดงในรูปที่ 6

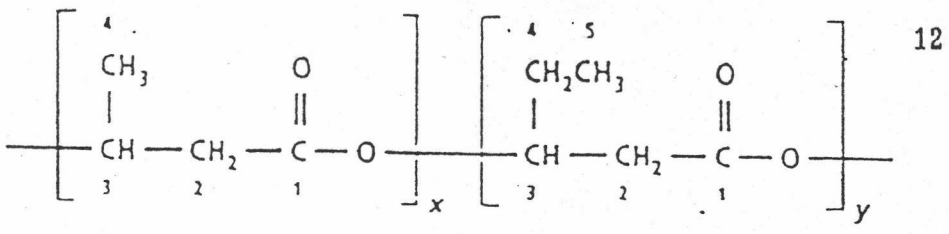



รูปที่ 5 โครมาโตแกรมของอนุพันธ์เมทธิลเอสเทอร์ของ กรดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิริก (1) กรดเบต้าไฮดรอกซีวาเลอริก (2) กรด-4-ออกโซวาเลอริก (3) และกรดเบนโซอิก (4) (สารมาตรฐานภายใน) (Comeau และคณะ,1988)

นอกจากวิธีทางโครโมโตรกราฟีแล้ววิธี NMRเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้บอกถึงชนิดองค์ประกอบและปริมาณของโมโนเมอร์แต่ละชนิดของPHAได้ ในปี 1986 Doi และคณะ ได้วิเคราะห์โคโพลีเมอร์ P(3HB-CO-3HV) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 โดยเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างโซเดียมอะซีเตท(C2) และโซเดียมโพรพิโนเอต(C3) โดยวิธี NMR พบว่า $^{13}C$ NMR spectrum มีลักษณะดังรูปที่6 สเปกตรัมของ 125-MHz $^{13}C$ NMR ของ P(3HB-CO-3HV) ประกอบด้วยสัญญาณหลัก 8 สัญญาณเรียงลำดับสัญญาณน้อยไปมาก ดังนี้ หมู่เมทธิล(-CH3)ของHV หมู่เมทธิล (-CH3)ของHB หมู่เมทธิลีน (-CH2-)ของHV หมู่เมทธิลีน (-CH2-) ที่อยู่ถัดจากหมู่คาร์บอนิล (-C=O) ของ HV และ HB หมู่เมทธีน (-CH-)ของHB หมู่เมทธีน(-CH-)ของHV และหมู่คาร์บอนิล (-C=O) ของ HB และ HV ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bluhm Hamer และ Marchessault(1986) ดังแสดงในรูปที่ 7 นอกจากนี้สัญญาณของหมู่เมทธิล เมทธิลีนและ หมู่คาร์บอนิลจาก HB ของโคโพลีเมอร์จะปรากฏสัญญาณที่ตำแหน่งเดียวกันกับของ HB จาก PHB ซึ่งได้จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 และ *Bacillus megatenium* (Doi และคณะ ,1986) โดยการเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง กลูโคส และกรดโพรพิโอนิก

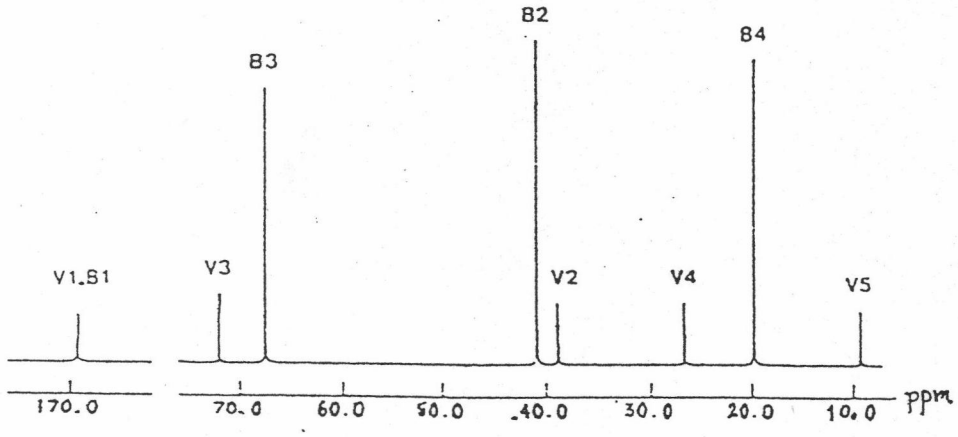



รูปที่6 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี $^{13}C$ NMR Spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 ในคลอโรฟอร์มที่ 125 MHz 27° ซ (Doi และคณะ,1986)



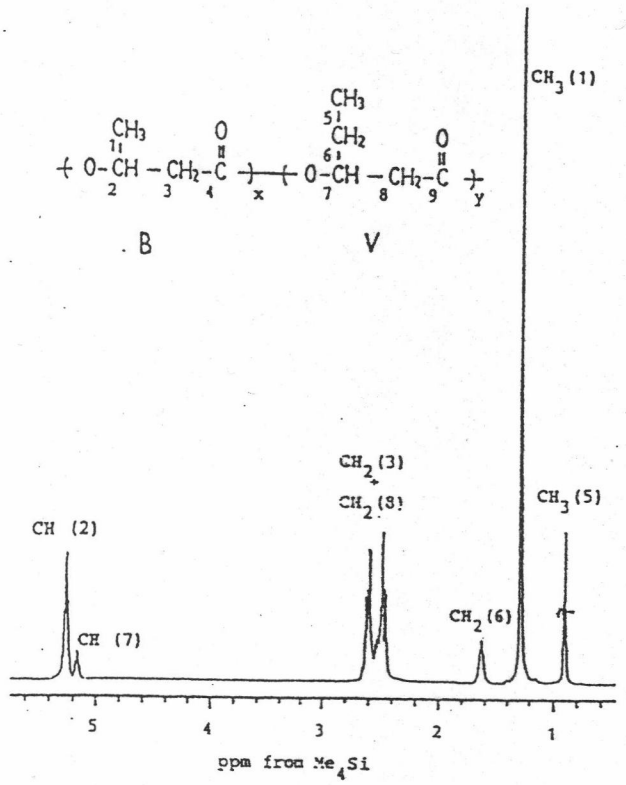
12

HB HV



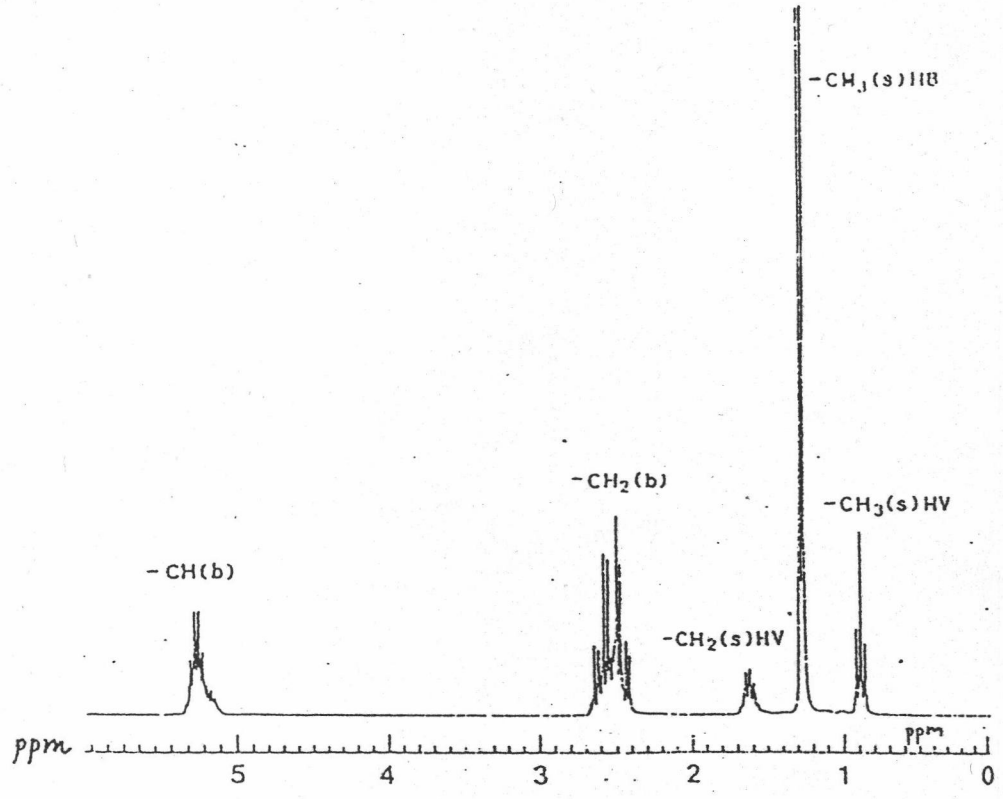

รูปที่ 7 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี $^{13}C$ NMR Spectroscopy ของโคโพลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก ICI ในคลอโรฟอร์มที่ 62.9 MHz 32° ซ (Bluhm Hamer และ Marchessault , 1986)

นอกจากนี้ Doi และ คณะ (1986) ได้รายงานสเปกตรัมของ 500 MHz $^{1}H$ NMR ของ P(3HB -co-3HV) เรียงลำดับจากสัญญาณน้อยไปมากสเปกตรัมประกอบด้วยสัญญาณจากโปรตอนของหมู่เมทธิลของHV หมู่เมทธิลของHB หมู่เมทธิลีนของ HV หมู่เมทธิลีนที่อยู่ถัดจากหมู่คาร์บอนิลของHB และ HV หมู่เมทธีนของHV และ หมู่เมทธีนของHB ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bloembergen และ คณะ (1986)(รูปที่ 9) การคำนวณปริมาณของโมโนเมอร์ (mole fraction) ของ 3HB และ 3HV ในโคโพลีเมอร์ P (3HB-co-3HV) สามารถทำได้ โดยวิเคราะห์จากอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสัญญาณจากโปรตอนของ หมู่เมทธิลของ HB ที่ 1.274 ppm (doublet resonance) เทียบกับสัญญาณจากโปรตอนของหมู่เมทธิลของ HV ที่ 0.894 ppm (triplet resonance) (Doi และคณะ, 1986) โดยหลักการแล้วสามารถคำนวณได้จากสัญญาณของหมู่เมทธิลีนที่ side chain ของ HV ที่ ~ 1.64 ppm แต่วิธีการคำนวณนี้ไม่ได้รับการสนับสนุน เพราะน้ำที่อาจมีอยู่เป็นปริมาณน้อยในตัวอย่างหรือในคลอโรฟอร์มจะทำให้เกิดสัญญาณแทรก (impurity) ที่ ~1.67 ppm ซึ่งจะเหลื่อมซ้อนกันกับสัญญาณที่ 1.64 ppm ทำให้คำนวณได้สัดส่วนของ HV สูงกว่าปริมาณจริงเล็กน้อย ความผิดพลาดจะเพิ่มขึ้นมากเมื่อตัวอย่างมีน้ำอยู่ (Bloembergen และคณะ, 1986)



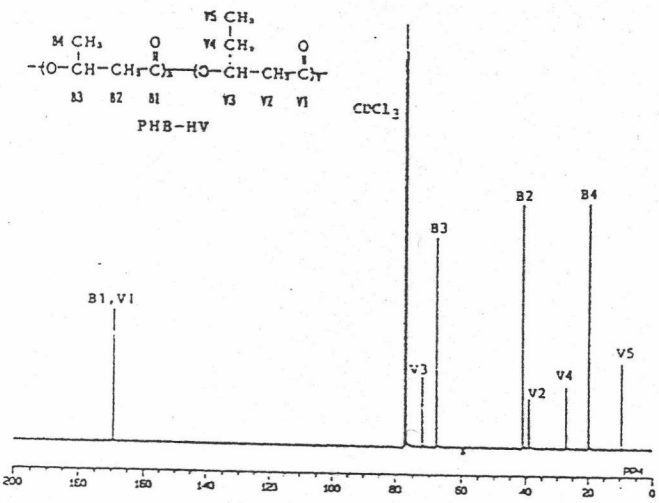

B V

รูปที่ 8 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี $^{1}H$ NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 ในคลอโรฟอร์มที่ 500 MHz (Doi และคณะ, 1986)

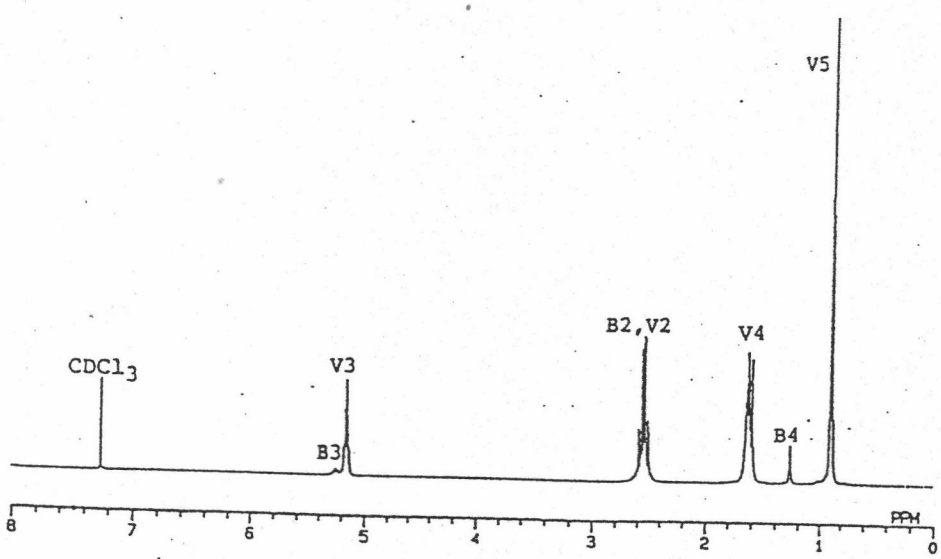



รูปที่ 9 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี $^{1}H$ NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก ICI ที่ 250 MHz (Bloembergen และคณะ, 1986)

ในปี 1989 Kamiya และคณะ ได้เลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ NCIB 11599 ในแหล่งคาร์บอนผสมของกรดวาเลอริก (C5) และกรดบิวทิริก (C4) ต่อมาสกัดแยกโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) และนำมาวิเคราะห์ด้วย $^{13}C$ และ $^{1}H$ NMR spectroscopy ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานที่ได้เสนอข้างต้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าลักษณะของแต่ละโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของโคโพลิเมอร์จะไม่ขึ้นกับ ชนิดของแบคทีเรีย และชนิดของแหล่งคาร์บอน

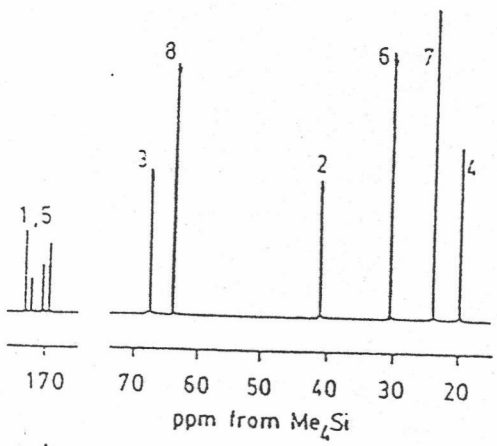



รูปที่ 10 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี $^{13}C$ NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ NCIB 11599 ในคลอโรฟอร์มที่ 67.6 MHz 30° ซ (Kamiya และคณะ, 1989)

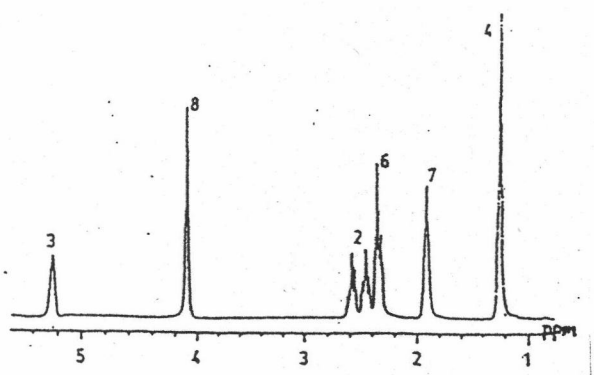



รูปที่ 11 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี $^{1}H$ NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ NCIB 11599 ในคลอโรฟอร์มที่ 500 MHz 30° ซ (Kamiya และคณะ ,1989)

Doi และคณะ (1988) ได้วิเคราะห์โคโพลิเมอร์ชนิดใหม่ คือ P(3HB-co-4HB) จาก *Alcaligenes eutrophus* ที่เจริญในแหล่งคาร์บอนผสมของ กรดบิวทิริก และ กรด-4-ไฮดรอกซีบิวทิริก พบว่า $^{13}C$ NMR spectrum มีลักษณะดังรูปที่ 10 สเปกตรัมของ 125 MHz $^{13}C$ NMR ของ P(3HB-co-4HB) ประกอบด้วยสัญญาณหลักเรียงตามลำดับสัญญาณน้อยไปมากดังนี้ หมู่เมทธิล (คาร์บอน 4) ของ 3HB หมู่เมทธิลีน (คาร์บอน 7 และ6) ของ 4HB หมู่เมทธิลีน (คาร์บอน 2) ของ 3HB หมู่เมทธิลีน (คาร์บอน 8) ของ 4HB หมู่เมทธีน (คาร์บอน 3)ของ 3HB และหมู่คาร์บอนิล(คาร์บอน 1 และ 5) ของ 3HB และ 4HB $^{1}H$ NMR spectrum ของ P(3HB-co-4HB) มีลักษณะดังรูปที่ 11 ซึ่งประกอบด้วยสัญญาณจากโปรตอนของหมู่เมทธิล (คาร์บอน 4) ของ 3HB หมู่เมทธิลีน (คาร์บอน 7 และ 6) ของ4HB หมู่เมทธิลีน (คาร์บอน 2) ของ 3HB หมู่เมทธิลีน (คาร์บอน 8) ของ 4HB หมู่เมทธีน (คาร์บอน 3) ของ 3HB

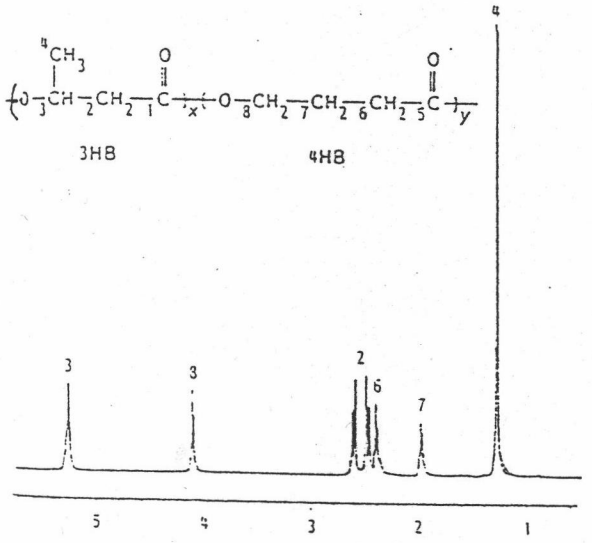



รูปที่ 12 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี $^{13}C$ NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-4HB) จาก *Alcaligenes eutrophus* ในคลอโรฟอร์มที่ 125 MHz 27° ซ (Doi และคณะ ,1988)




รูปที่ 13 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี $^{1}H$ NMR spectroscopy ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-4HB) จาก *Alcaligenes eutrophus* ในคลอโรฟอร์มที่ 500 MHz 27° ซ (Doi และคณะ,1988)

Kunioka Nakamura และ Doi (1988) ได้เสนอ $^1$H NMR spectrum ของเทอร์โพลีเมอร์ชนิดใหม่คือ P (3HB-4HB-3HV) จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ ATCC 17699 (รูปที่ 14) ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริก และกรด 4-ไฮดรอกซีบิวทิริก

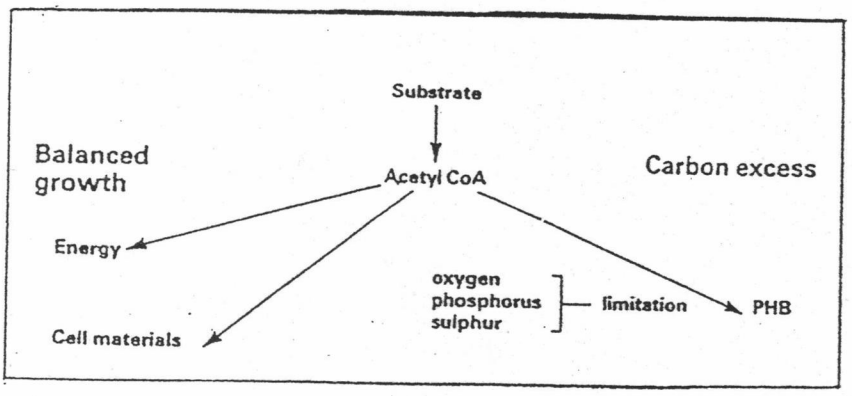



รูปที่ 14 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี $^1$H NMR spectroscopy ของเทอร์โพลีเมอร์ P(3HB-4HB-3HV) จาก *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ ATCC 17699 ในคลอโรฟอร์มที่ 500 MHz 27° ซ (Kunioka Nakamura และ Doi,1988)

การสังเคราะห์และการย่อยสลาย PHA ภายในเซลล์

ในปี 1973 Dawes และ Senior ได้รายงานว่าในการผลิต PHB ของจุลินทรีย์โดยทั่วไป พบว่ากระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHB จะเกิดขึ้นสูงหลังจากการเจริญของแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด และอยู่ภายใต้สภาวะสารอาหารไม่สมดุลย์ (nutrient imbalance) กล่าวคือเมื่อเซลล์จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดสมดุลย์ โดยมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีสารบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ในปริมาณจำกัด Heinzle และ Lafferty (1980) รายงานว่า *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 จะเข้าสู่ระยะการเจริญ (growth phase) และมีการสังเคราะห์โปรตีนเมื่อมีปริมาณแอมโมเนียม ($NH_4$) เพียงพอ และการสังเคราะห์ PHB จะเพิ่มขึ้นภายหลังที่การสังเคราะห์โปรตีนสิ้นสุดลง และไม่มีแอมโมเนียมเหลืออยู่ จึงเข้าสู่ระยะสะสม (storage phase) Ward และคณะ (1977) รายงานว่า *Azotobacter*

*beijerinckii* สามารถสะสม PHB ได้ถึง 74 % ต่อน้ำหนักแห้งในสภาวะที่มีการจำกัดปริมาณออกซิเจน และให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในปี 1989 Steinbuchel และ Schlegel พบว่าเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์กลายพันธุ์โดยมีแลคเตท กลูโคเนท หรือกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน แต่จำกัดปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต ฟอสเฟต โปตัสเซียม หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง พบว่ามีผลให้เซลล์มีการสะสม PHB เพิ่มขึ้น Mulchandani และคณะ (1989) พบว่าอัตราการเจริญของ *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17699 จะขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตกับฟรุกโตส (N/C) โดยอัตราส่วนที่ต่ำจะส่งเสริมให้มีการเจริญได้ดี ในขณะที่อัตราส่วนที่สูงจะยับยั้งการเจริญ



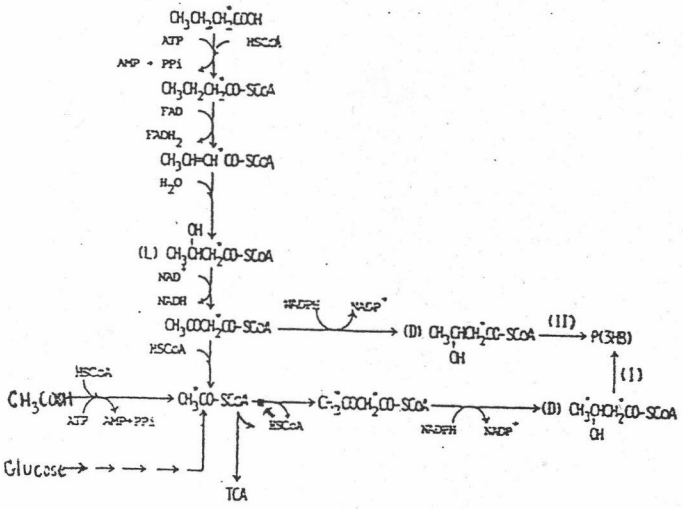

รูปที่ 15 วิถีการเปลี่ยน Acetyl CoA เมื่อเซลล์เจริญภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารสมดุลย์ (balance growth) และสภาวะที่สารบางอย่างถูกกำจัดแต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ (carbon excess) (Byrom, 1987)

Oeding และ Schlegel (1973) ตั้งสมมุติฐานว่าวิถีการสังเคราะห์ PHB ควรจะเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยน่าจะเริ่มต้นจากอะซิติลโคเอ เปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ และเป็นไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการโพลีเมอไรเซชั่น(polymerization)ของไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ซินติเทส (PHB synthetase) และ PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรทดีไฮโดรจีเนส (3-hydroxybutyrate dehydrogenese) เอนไซม์นี้จะถูกควบคุมการทำงานโดยปริมาณของ acetoacetate และ NADH ภายในเซลล์ Doi และคณะ (1987) ได้ศึกษาวิถีสังเคราะห์ PHB โดย *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ 17699 โดยใช้โซเดียมอะซิเตทที่ติดฉลากกัมมันตภาพรังสี($^{13}$C-labeled acetate)ที่ตำแหน่ง

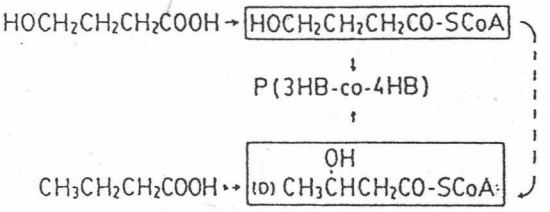
คาร์บอนิลคาร์บอน (1-$^{13}$C) และ เมทธิลคาร์บอน (2-$^{13}$C) จากการวิเคราะห์โดยวิธี $^{13}$C NMR และ $^{1}$H NMR สนับสนุนว่า PHB สังเคราะห์มาจากอะซิติลโคเอ (C2) จากโซเดียมอะซิเตท โดยผ่านปฏิกริยารวมตัว(condensation) เป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ(C4) และเป็น 3-ไฮดรอก-ซีบิวทิริลโคเอ (C4) ตามลำดับและเกิดกระบวนการโพลีเมอไรเซชั่น โดยเอนไซม์โพลีเมอเรส (PHB polymerase) ในทำนองเดียวกันศึกษาวิถีการสังเคราะห์ P(3HB-CO-3HV) จากโซเดียมโพรพิโอเนทที่ติดฉลากกัมมันตภาพรังสี พบว่าบางส่วนของโซเดียมโพรพิโอเนทมีการตัดที่คาร์บอนิลคาร์บอนไปเป็นอะซิติลโคเอ และผ่านการเมตาโบลิซึมจนเป็น 3HB 3HV จะได้มาจากโพรพิโอนิลโคเอ (C3) กับอะซิติลโคเอ (C2) Doi และคณะ (1987) ได้ศึกษาวิถีการสังเคราะห์ โคโพลีเมอร์ ของ 3HB และ 3HV จากการเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ NCIB 11599 ด้วยกรดวาเลอริก พบว่าเมื่อใช้กรดวาเลอริกเพียงอย่างเดียวโคโพลีเมอร์ที่ได้จะมี 3HV สูงถึง 90 โมลเปอร์เซนต์ โดย Doi และคณะได้เสนอว่ากรดวาเลอริกส่วนใหญ่ถูกเมตาโบไลซ์ไปเป็น 3-ไฮดรอกซีวาเลอริลโคเอซึ่งเป็น 3HVโดยตรงไม่มีการตัดของสายคาร์บอน (Carbon Skeleton) และ กรดวาเลอริกที่เหลือจะสลายได้อะซิติลโคเอ และ โพรพิโอนิลโคเอ อะซิติลโคเอ ผ่านกระบวนการรวมตัวได้เป็น 3HB ต่อมาเกิดปฏิกริยาโพลีเมอไรเซชั่นได้เป็น P (3HB-CO-3HV) โดยเอนไซม์โพลีเมอเรส ( PHB โพลีเมอเรส) ต่อมาในปี 1988 Doi และคณะได้สรุปวิถีการสังเคราะห์ PHB และ P(3HB -CO-3HV) เป็น 2 วิถี ดังรูปที่ 16

วิถีที่ 1 สรุปจากการศึกษาของ Oeding และ Schlegel (1973) และ Senior และ Dawes (1973) กล่าวคือเป็นวิถีการสังเคราะห์ 3HB จากน้ำตาลเฮกโซส (กลูโคส หรือ ฟรุกโตส) และ โซเดียมอะซิเตท ซึ่งต้องผ่านกระบวนการปฏิกริยารวมตัวของอะซิโตอะซิติลโคเอ ไปเป็น บิวทิริลโคเอ

วิถีที่ 2 จากการศึกษาของ Doi และ คณะ(1988)เป็นวิถีการสังเคราะห์ P(3HB) จากกรดบิวทิริก และ P(3HB-CO-3HV)จากกรดวาเลอริก หรือกรดวาเลอริก กับกรดบิวทิริก วิถีนี้ทั้ง 3HB ที่ได้จากกรดบิวทิริกและ 3HV จากกรดวาเลอริกจะไม่มีการตัดหลักสายของคาร์บอน และในปี 1989 Kunioka Kawaguchi และ Doi ได้เสนอวิถีการสังเคราะห์โคโพลีเมอร์ P(3HB-co-4HB) จากการเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ ATCC 17699 โดยกรด-4-ไฮดรอกซีบิวทิริก พบว่าบางส่วนของ 4-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ จะถูกเมตาโบไลซ์เป็น 3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ และเกิดการโพลีเมอไรเซชั่นโดยเอนไซม์โพลีเมอเรสได้เป็น P(3HB-4HB) (รูปที่17)



รูปที่ 16 วิถีการสังเคราะห์ PHB จากกลูโคส และ P(3HB-co-3HV) จากกรดวาเลอริก ใน *Alcaligenes eutrophus* ( Doi และคณะ ,1988)

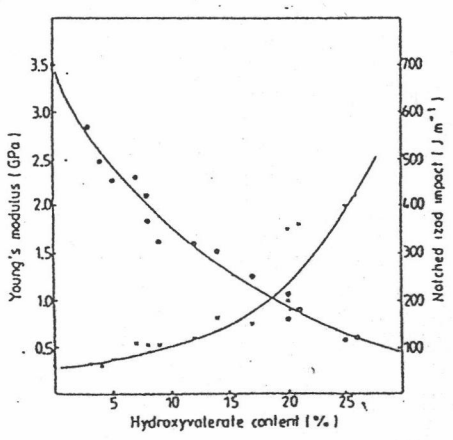


รูปที่ 17 วิถีการสังเคราะห์ P(3HB-4HB) จากกรด-4-ไฮดรอกซีบิวทิริก และ กรดบิวทิริก (Kunioka และคณะ , 1988)

ลักษณะและคุณสมบัติของ PHB และ โคโพลีเมอร์

ในปี 1973 Dunlop และ Robard ได้ศึกษาแกรนูลของ PHB จาก *Bacillus cereus* หลังจากการเตรียมตัวอย่างโดยวิธี freeze etching และนำมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าโพลีเมอร์ในแกรนูลแสดงลักษณะ stretching patterns ซึ่งเป็นคุณสมบัติโดยธรรมชาติของโพลิเอสเทอร์ นอกจากนี้ยังได้เสนอว่าสามารถนำ PHB มาผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับเทอร์โมพลาสติกได้ จึงอาจกล่าวได้ว่าจุดนี้ทำให้เกิดความสนใจในการนำพลาสติกจากธรรมชาติมาใช้และผลิตในระดับอุตสาหกรรม Holmes ซึ่งทำงานที่บริษัท ICI ได้ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของ PHB กับ PP (ตารางที่ 3) พบว่า PHB มีคุณสมบัติทางโพลิเมอร์ที่คล้ายกับ PP เช่น จุดหลอมเหลว ระดับความเป็นผลึก ( degree of

crystallinity) อุณหภูมิสภาพแก้ว (glass transition temperature) หรือ Tg นอกจากนี้ทั้ง PHB และ PP มีหมู่เมทธิลเป็นหมู่ข้างเคียง (side chain) และมีการเรียงตัวของโมโนเมอร์ในสายโพลีเมอร์แบบหัวต่อหาง(isotactic)เหมือนกัน คุณสมบัติที่ดีของ PHB และต่างจาก PP คือ PHB สามารถย่อยสลายได้และทนต่อ UV บริษัท ICI จึงได้ทำการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมโดย *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 และใช้ชื่อทางการค้า ไบโอโพล (Biopol) แต่คุณสมบัติเชิงกลของ PHB ยังด้อยกว่า PP เนื่องจาก PHB เป็นโฮโมโพลีเมอร์ที่มีความแข็ง (stiffness) และเปราะ (brittleness) กว่า PP Holmes ยังได้รายงานว่าแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ PHB สามารถสังเคราะห์โคโพลีเมอร์ได้ เช่น P(3HB-co-3HV) และจากการศึกษาสมบัติเชิงกลพบว่า PHB เมื่ออยู่ในรูปของโคโพลีเมอร์ที่มี 3HV ร่วมด้วยจะทำให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น กล่าวคือเมื่อมี 3HV อยู่ในสายโพลีเมอร์จะทำให้ระดับความเป็นผลึก Tg และจุดหลอมเหลวลดลง ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงกลทำให้โพลีเมอร์มีความแข็งลดลงแต่มีความเหนียว (toughness) เพิ่มขึ้น (รูปที่ 18) ดังนั้น ICI จึงได้หันมาผลิตโคโพลีเมอร์และใช้ชื่อทางการค้าว่า ไบโอโพล เช่นเดียวกัน ปริมาณของ 3HV ที่ไม่เท่ากันทำให้ได้โคโพลีเมอร์ที่มีคุณสมบัติไม่เหมือนกันเหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขึ้น กล่าวคือถ้ามี 3HV ในปริมาณน้อยจะได้โคโพลีเมอร์ที่มีความแข็งและเปราะคล้ายกับ PVC ถ้ามี 3HV ในช่วงกลางโพลีเมอร์จะมีความสมดุลย์ระหว่างความแข็งและความเหนียวคล้ายกับ PP และถ้ามี 3HVในปริมาณมากจะทำให้โพลีเมอร์มีความอ่อนและเหนียวคล้ายกับ PE ในทำนองเดียวกัน Scandola และคณะ (1990) พบว่าโคโพลีเมอร์ของ P(3HB-co-4HB) มี Tg และจุดหลอมเหลวลดลงเมื่อมี 4HB เพิ่มขึ้นในสายของโพลีเมอร์ จากหลักการนี้เราสามารถควบคุมคุณสมบัติของโพลีเมอร์ได้โดยการทำให้อยู่ในรูปโคโพลีเมอร์ที่มีชนิด และปริมาณของโมโนเมอร์ตามต้องการหรือเรียกว่า tailor made ความสามารถในการผลิต PHA ให้อยู่ในรูปโฮโมโพลีเมอร์ หรือ โคโพลีเมอร์ที่มีสัดส่วนและชนิดของโมโนเมอร์ต่างๆ กัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของแหล่งคาร์บอน




รูปที่18 ปริมาณของ 3HV ในโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV)ที่มีผลต่อค่า Young`s modulus (stiffness) และค่า Notched izod impact (toughness) (Holmes,1985)

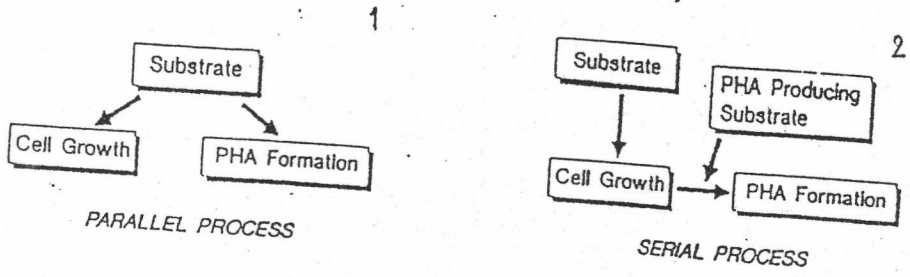
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของ PP และ PHB

(Evans และ Sikdar, 1990; Brandl และคณะ, 1990)

| คุณสมบัติ | PP | PHB |
|---|---|---|
| จุดหลอมเหลว (°C) | 171-186 | 171-182 |
| ความสามารถเป็นผลึก (%) (crystallinity) | 65-70 | 65-80 |
| ความหนาแน่น ($g/cm^3$) | 0.95-0.94 | 1.23-1.25 |
| น้ำหนักโมเลกุล ($\times 10^5$) | 2.2-7 | 1-8 |
| การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution) | 5-12 | 2.2-3 |
| ความแข็ง (GPa) (flexurul modulus) | 1.7 | 3.5-4 |
| ความสามารถในการต้านแรงดึง (MPa) (tensile strenght) | 39 | 40 |
| ความสามารถในการขยายตัว (%) (extension to break) | 400 | 6-8 |
| ความทนทานต่อแสงอุลตราไวโอเลต (uv resistance) | ไม่ดี | ดี |
| ความทนทานต่อตัวทำละลาย (solvent resistance) | ดี | ไม่ดี |
| ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน ($cm^3\ m^{-2}\ atm^{-1}\ d^{-1}$) (oxygen permeability) | 1700 | 45 |

การสร้างและสะสม PHA

กระบวนการทางชีวเคมีสำหรับการสร้าง PHA มี 2 แบบคือ กระบวนการแบบขั้นตอนเดียว คือมีการสร้าง PHA พร้อมกับการเจริญของเซลล์ และกระบวนการแบบ 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกจะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่อุดมสมบูรณ์เพื่อให้ปริมาณเซลล์มาก แล้วจึงใส่อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเหมาะสำหรับการผลิต PHA (รูปที่ 19)




รูปที่ 19 แสดงการสร้าง PHA กระบวนการแบบขั้นตอนเดียว (1) และ กระบวนการแบบ 2 ขั้นตอน (2) (Brandl และคณะ,1990)

การผลิต PHA ในระดับใหญ่โดยนิยมใช้แบบ 2 ขั้นตอน สำหรับ *Alcaligenes eutrophus* โดยทั่วไปถ้าให้แหล่งคาร์บอนที่มีคาร์บอนอะตอมเลขคู่ เช่น กรดอะซิติก (C2) กรดบิวทิริก(C4) กลูโคส หรือ ฟรุกโตส (C6) จะได้โฮโมโพลีเมอร์คือ PHB ถ้าให้คาร์บอนอะตอมคี่ผสมกับอะตอมคู่ เช่น กรดวาเลอริก(C5)ร่วมกับกรดบิวทิริก(C4) หรือ อะตอมคี่จะได้โคโพลีเมอร์ เช่น P(3HB-co-3HV) สัดส่วนและชนิดของโมโนเมอร์สามารถควบคุมได้โดยการให้แหล่งคาร์บอนผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ดังนั้นคุณสมบัติของโพลีเมอร์จะถูกควบคุมได้โดยการให้แหล่งคาร์บอนนั่นเอง (Brandl และคณะ, 1990) ในปี 1985 Holmes พบว่า *Alcaligenes eutrophus* สามารถสังเคราะห์โคโพลีเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนผสมประกอบด้วย กลูโคสและกรดโพรพิโอนิก ปริมาณของ 3HV ในสายโพลีเมอร์ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างกลูโคสและกรดโพรพิโอนิก โดยสามารถผลิตโคโพลีเมอร์ได้สูงถึง 70% ของน้ำหนักแห้ง และมี 3HV เท่ากับ 33 โมลเปอร์เซนต์ ต่อมาในปี 1986 Doi และคณะได้เลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างโซเดียมอะซิเตท และโซเดียมโพรพิโอเนท ปริมาณของ 3HV ในโคโพลีเมอร์เท่ากับ 43 โมลเปอร์เซนต์ และมีปริมาณคิดเป็น 35 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อมาในปี 1987 Doi และคณะได้รายงานเพิ่มว่า *Alcaligenes eutroplus* สายพันธุ์ NCIB 11599 สามารถสร้างโคโพลีเมอร์ที่มีหน่วยของ 3HV สูงถึง 90 โมลเปอร์เซนต์ เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่ง

คาร์บอนเดี่ยวๆ เมื่อใช้กรดวาเลอริกร่วมกับกลูโคสจะได้ 3HV มากกว่า เมื่อใช้กลูโคสร่วมกับกรดโพรพิโอนิก (Haywood และคณะ, 1989) Doi และคณะ (1988) รายงานว่า *Alcaligenes eutrophus* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดบิวทิริกและกรดวาเลอริกเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ในการสร้างโคโพลีเมอร์ปริมาณ 3HV ในโคโพลีเมอร์จะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของกรดบิวทิริกและกรดวาเลอริก โดยมี 3HV อยู่ในช่วงระหว่าง 0 ถึง 85 โมลเปอร์เซนต์ และปริมาณโคโพลีเมอร์อยู่ในช่วง 37 ถึง 55% ต่อน้ำหนักแห้ง Kunioka และคณะ(1988)ได้รายงานว่าพบโคโพลิเมอร์ชนิดใหม่คือ P(3HB-co-4HB)โดย *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี กรด-4-ไฮดรอกบิวทิริก ร่วมกับ กรดบิวทิริก ปริมาณของ 4HB ในโคโพลีเมอร์ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของคาร์บอนทั้งสองชนิด ปริมาณโคโพลีเมอร์อยู่ในช่วง 16 ถึง 52 % ต่อน้ำหนักแห้ง โดยมีปริมาณ 4HB เท่ากับ 0 ถึง 33 โมลเปอร์เซนต์ นอกจากนี้เมื่อให้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง กรด-4-ไฮดรอกซีบิวทิริก และกรดวาเลอริก จะได้เทอร์โพลีเมอร์ P(3HB-4HB-3HV) ปริมาณ 18 ถึง 51 % ต่อน้ำหนักแห้ง ในปีเดียวกัน Doi และคณะพบว่า *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ H16 สามารถสร้าง P(3HB-co-4HB) จากแกมมา-บิวทิโรแลคโทน ต่อมาในปี 1989 Kunioka และคณะ ได้รายงานเพิ่มเติมว่านอกจากการใช้ แกมมา-บิวทิโรแลคโทนแล้ว *Alcaligenes eutrophus* H16 ยังสามารถใช้ กรด-4-คลอโรบิวเทอริก 1,4-บิวเทนไดออล เพื่อเป็นแหล่งของ 4HB ได้ ในปี 1992 Steinbuchel และ Pieper ได้รายงานว่า *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ R3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ (isoleucine auxotreophic mutant) จากสายพันธุ์ H16 พบว่าสามารถสร้าง P(3HB-co-3HV) จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโคโพลีเมอร์ เช่น ฟรุกโต กลูโคเนท ซัคซิเนท อะซิเตท หรือแลคเตท ในสภาวะที่จำกัดแหล่ง ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และแมกนีเซียม แต่ปริมาณของ 3HV ที่พบสูงสุดเพียง 8 โมลเปอร์เซนต์ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้าง 3HV นี้ เนื่องมาจากเมตาโบลิซึมที่เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนที่ถูกเปลี่ยนแปลงไป Akiyama และคณะ (1992) พบ *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ใหม่ AK201 ซึ่งมีความสามารถเจริญและสร้าง PHA ได้จากแหล่งคาร์บอน เช่น กรดอัลคาโนอิก (n-alkanoic acid) ที่มีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 2 ถึง 22 อะตอม นอกจากนี้ยังใช้ น้ำมันพืช และ ไขมันจากสัตว์ เป็นแหล่งคาร์บอนได้ พบว่าเมื่อให้กรดที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเลขคู่จะได้ PHB แต่ถ้าเป็นคาร์บอนอะตอมเลขคี่จะให้ P(3HB-co-3HV) ส่วนโพลิเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงด้วยน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์จะเป็น PHB เพียงอย่างเดียว นอกจาก *Alcaligenes eutrophus* แล้วยังมีรายงานการใช้เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas*

*oleovoraus* สามารถเจริญได้เมื่อใช้อัลเคนและอัลคีนที่มีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 6 ถึง 12 อะตอม โคโพลีเมอร์ที่ได้ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีความยาวของคาร์บอนเท่ากับของสับสเตรทที่ให้ และที่เหลือเป็นโมโนเมอร์ที่มีความยาวของคาร์บอนอะตอมลดลง 2 อะตอม Gross และ คณะ (1989) รายงานว่า *Pseudomonas oleovorans* สามารถสร้างเฮทเทอโรโพลีเมอร์จากโซเดียมอัลคาโนเอทที่มีความยาว 6 ถึง 12 อะตอม จากทั้งสองรายงานไม่พบการสร้าง PHB และ P(3HB-co-3HV) Ramsay และคณะ (1989) พบว่า *Pseudomonas cepacia* สามารถใช้ฟรุกโตสเพื่อสร้างและสะสม PHB ได้สูงถึง 50 % ต่อน้ำหนัก และสามารถสะสม P(3HB-co-3HV) ซึ่งมี HV 30 โมลเปอร์เซนต์ เมื่อให้กรดโพรพิโอนิกร่วมกับฟรุกโตส ในปี 1992 Bourgue และคณะได้แยกเชื้อ *Methylobac terium extorqueus* จากดิน พบว่าเชื้อนี้สามารถสร้าง PHB จากเมทธานอล และสามารถสร้างP(3HB-co-3HV)เมื่อให้โซเดียมวาเลอเรทร่วมกับเมทธานอล Steinbuchel และคณะ (1992) ได้รายงานว่า *Chromobacterium violaceum* สามารถสะสมโฮโมโพลิเมอร์ P(3HV) สูงถึง 65 % ต่อน้ำหนักแห้งโดยการหมักแบบ fed-batch เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน และสะสม P(3HB)เมื่อให้ ฟรุกโตส กลูโคเนท โพรพิโอเนท และ เฮกซะโนเอทเป็นแหล่งคาร์บอน William และคณะ (1994) ได้เสนอการสร้าง P(3HB-co-3HV) จากกรดซัคซินิก โดย 3HV ได้มาจากการเชื่อมกันระหว่างพิโอนิลโคเอ (C3) และอะซิติลโคเอ(C2) ซัคซินิกจะถูกเมตาโบไลซ์ผ่านทางเมทธิลมาโลนิลโคเอ (methylmolonyl CoA) และได้เป็นโพรพิโอนิลโคเอ และในปี 1994 Taidi และคณะได้ศึกษาผลของชนิดคาร์บอน และ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแหล่งคาร์บอน ที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ที่ผลิตโดย *Methylobacterium extorquens* และ *Alcaligenes eutrophus* พบว่าสำหรับ*Methylobacterium extorquens* ถ้าให้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นต่ำจะได้น้ำหนักโมเลกุลของ PHB สูง ซึ่งต่างจาก *Alcaligenes eutrophus* คือ ชนิดของคาร์บอน (ฟรุกโตส อะซิเตท กรดบิวทิริก) และความเข้มข้นเริ่มต้นไม่มีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ซึ่งมีค่าสูงอยู่แล้ว

การย่อยสลายของ PHA

PHA เป็นโพลีเมอร์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์และถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในธรรมชาติ โดยทั่วไปพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลาย และช่วงเวลาที่พลาสติกที่ยังคงอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ สภาพแวดล้อม ชนิดของจุลินทรีย์ กิจกรรมของจุลินทรีย์ ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ ความหนาของพลาสติก พื้นที่ผิวและลักษณะพื้นผิวของพลาสติก ซึ่งมีผลต่อการโคโลไนเซชั่นของ

แบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นอีกที่มีผลต่อการย่อยสลายของพลาสติกโดยจุลินทรีย์ ได้แก่ ความพรุน การเติมสารฟิลเลอร์ สารให้สี ค่า BOD และการให้สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เป็นต้น กระบวนการย่อยสลายในธรรมชาติพบว่าสามารถเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Holmes, 1985)

กลไกการย่อยสลาย PHA แบ่งออกเป็น

1 ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

PHA จะถูกย่อยสลายโดยกระบวนการไฮโดรไลซิส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ pH สูง การย่อยสลายแบบนี้มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น นำ PHA มาทำเป็นพาหะของตัวยาและค่อยๆ ปล่อยยาออกมา หรือใช้เป็นไหมเย็บแผล (Holland และคณะ, 1987)

2 ภายใต้สภาวะการย่อยในธรรมชาติ

PHA จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ ดีโพลีเมอเรส(depolymerases) หรือ เอนไซม์เอสเตอเรส (esterases) จากจุลินทรีย์ เช่น *Alcaligenes faecalis* (Tanio และคณะ, 1982) *Pseudomonas lemoignei* (Lusty และ Doudoroff, 1966; Nakamura และคณะ,1985) และ *Penicillium simplicissmum* (Chowdury, 1963) หลังจากการย่อยสลายแล้วจะได้สารอินทรีย์ ซึ่งจะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ ( Brandl และคณะ, 1990)

ในปี 1989 Kunioka และคณะ ได้ศึกษาการย่อยสลายแผ่นฟิล์มหนา 0.07 มล.ในดินและใน activated sludge การย่อยสลายในดินเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 20-30° ซ ได้ผลดังนี้ การย่อยสลายของ P(3HB-co-9%4HB)จะเร็วที่สุด ในขณะที่การย่อยสลายของ PHB จะใกล้เคียงกับการย่อยสลาย P(3HB-50% 3HV) ใน activated sludge ที่อุณหภูมิ 30° ซ พบว่าแผ่นฟิล์มทั้งสามจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ภายใน 2 สัปดาห์ จึงสรุปว่าอัตราการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นถ้ามี 4HB Mergarert และคณะ (1994)ได้ศึกษาการย่อยสลายของ PHB และ P(3HB-10% 3HV) ในดิน จากแหล่งต่างๆ ที่มี pH ต่างกัน พบว่าอัตราการย่อยของโคโพลีเมอร์จะเร็วกว่าโฮโมโพลีเมอร์ในทุกสภาวะการทดลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่อุณหภูมิสูงและแหล่งดินที่มี pH เป็นกรด เนื่องจากโคโพลีเมอร์มีระดับความเป็นผลึกต่ำจึงมีบริเวณที่เป็น amorphus มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์สกัด (Doi และคณะ, 1990) Mergarert และคณะได้สรุปว่าการย่อยสลายในดินอย่างน้อยมี 2 ระดับ คือ ตอนแรกจะเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิสอย่างง่าย (simple hydrolysis) ตลอด

ทั่วทั้งตัวอย่างมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลลดลง ต่อมาจึงเกิดการย่อยโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ได้เป็น low-molecular weigth fragment ซึ่งจะถูกเมตาโบไลซ์อย่างรวดเร็วมีผลทำให้น้ำหนักของตัวอย่างลดลง

การนำ PHA มาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

บริษัท ICI ได้ผลิต PHB และ P(3HB-co-3HV) ออกมาในรูปแบบต่างๆ ในทางอุตสาหกรรมได้นำมาผลิตเป็นภาชนะบรรจุของ เช่น ขวด ถุง ที่ห่อของ ฟิล์ม ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ในทางการแพทย์จะอาศัยคุณสมบัติในการเข้ากับสิ่งมีชีวิตได้ และสามารถย่อยสลายในสิ่งมีชีวิต โดยนำมาผลิตเป็น ไหมเย็บแผล เข็ม(surgical pins) ผ้าซับเลือด ผ้าพันแผล และแคปซูลบรรจุยาที่ต้องการให้ตัวยาค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมาและอยู่ในร่างกายได้นาน ทางด้านการเกษตรได้นำมาผลิตในรูปเม็ดเพื่อบรรจุสารบางชนิด เช่น ยาฆ่าแมลง ยาฆ่ารา ยาฆ่าวัชพืช และปุ๋ย เพื่อให้สารเหล่านี้ค่อยๆ ถูกปล่อยออกมาและมีฤทธิ์อยู่ได้นาน วิธีนี้จะช่วยให้การใช้ยาเหล่านี้ไม่สิ้นเปลืองและไม่ต้องใช้บ่อยครั้ง (Holmes, 1985) ในปี 1990 ที่ประเทศเยอรมันผลิตภัณฑ์ชิ้นแรกที่ออกสู่ผู้บริโภคคือ ขวดแชมพูที่ผลิตมาจาก P(3HB-3HV) จากปัญหาและอันตรายของพลาสติกที่ไม่ย่อยสลายที่มีต่อระบบนิเวศน์ โพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้จากจุลินทรีย์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ทดแทนได้ในบางส่วน เพื่อช่วยบรรเทาความรุนแรงของปัญหา ดังนั้นจึงควรส่งเสริมการพัฒนาเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้ดีขึ้น และใช้ประโยชน์ได้กว้างขึ้น เช่น การทำให้อยู่ในรูปโคโพลีเมอร์ การใส่สารเพื่อเพิ่มหรือปรับปรุงสมบัติเชิงกลของโพลีเมอร์ แม้ว่าข้อเสียเปรียบของโพลีเมอร์จากจุลินทรีย์ในเวลานี้คือราคาสูง เนื่องมาจากราคาของแหล่งคาร์บอน ขั้นตอนการสกัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ การวิจัยและพัฒนาการผลิตให้ได้ปริมาณสูงและวิธีการผลิตได้ในราคาต่ำจึงควรได้รับการสนับสนุนและทำอย่างต่อเนื่อง จากงานวิจัยของอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสม PHB ได้โดยใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน การเลี้ยงในระดับขวดเขย่าโดยใช้อาหาร MSM สูตรปรับปรุง ทำให้เชื้อนี้สร้าง และสะสม PHB ได้เท่ากับ 0.75 กรัม/ลิตร และเมื่อเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ทำให้ได้ PHB เพิ่มขึ้นเป็น 2.03 กรัม/ลิตร ต่อมาชนัญ ผลประไพ (2537) สภาวะการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณ PHB โดยควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm อุณหภูมิ 30 °ซ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในถังหมักเท่ากับ 100 % เมื่อให้ปริมาณฟรุกโตสเท่ากับ 30 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 7.21 กรัม/ลิตร

คิดเป็น 82 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เนื่องจาก PHB มีคุณสมบัติเชิงกลที่แข็งและเปราะ ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ ดังนั้นจึงต้องทำให้อยู่ในรูปโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติเชิงกลให้ดีขึ้นกล่าวคือ ลดความแข็งลงแต่เพิ่ม และความเหนียว ซึ่งสามารถทำได้โดยการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการสร้าง และสะสมโคโพลีเมอร์ P(3HB-3HV)

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาถึงศักยภาพของการผลิตโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ A-04 โดยศึกษาด้านชนิด ปริมาณ และอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอน ศึกษาลักษณะของโคโพลีเมอร์ โดยการตรวจสอบชนิดองค์ประกอบ และคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของโพลีเมอร์ที่ได้