บทความวิจัย

โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต: พลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรีย

ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด*
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 08-3190-8907 อีเมล: pradinunt_eiamsaard@yahoo.com DOI: 10.14416/j.kmutnb.2016.03.005
รับเมื่อ 3 กุมภาพันธ์ 2559 ตอบรับเมื่อ 23 มีนาคม 2559 เผยแพร่ออนไลน์ 16 กันยายน 2559
© 2017 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

เนื่องด้วยปัจจุบันการใช้ผลิตภัณฑ์จากพลาสติกที่สังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางปิโตรเคมีมีแน้วโน้มในการนำมาใช้ในชีวิตประจำวันมากยิ่งขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในด้านการจัดการของเสียที่เกิดขึ้น รวมทั้งกระบวนการผลิตยังก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย ดังนั้นเพื่อเป็นการลดปัญหาที่เกิดขึ้นจึงมีการศึกษาเพื่อหาวัสดุทดแทนพลาสติกสังเคราะห์แต่ยังคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของพลาสติกที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน นั่นคือการเลือกใช้พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable Plastic) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลาสติกชีวภาพกลุ่มโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates: PHAs) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ในบทความนี้กล่าวถึงการสังเคราะห์ PHA ของเซลล์แบคทีเรียซึ่งสามารถสะสม PHA ปริมาณสูงในรูปแบบเม็ดแกรนูลภายในเซลล์ และเนื่องจากปัจจุบันความต้องการ PHA ในระดับอุตสาหกรรมมีมากขึ้นจึงทำให้มีการศึกษาเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อเพิ่มปริมาณการสะสม PHA ภายในเซลล์แบคทีเรียและนำไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ: พลาสติกชีวภาพ, โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต, แบคทีเรีย

การอ้างอิงบทความ: ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด, "โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต: พลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรีย," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, ปีที่ 27, ฉบับที่ 1, หน้า 147–158, ม.ค.–เม.ย. 2560

วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีที่ 27 ฉบับที่ 1 ม.ค.–เม.ย. 2560
The Journal of KMUTNB., Vol. 27, No. 1, Jan.–Apr. 2017

Research Article

Polyhydroxyalkanoate: Bioplastic from Bacteria

Pradinunt Eiamsa-ard*
Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, Phranakhon Si Ayutthaya, Thailand

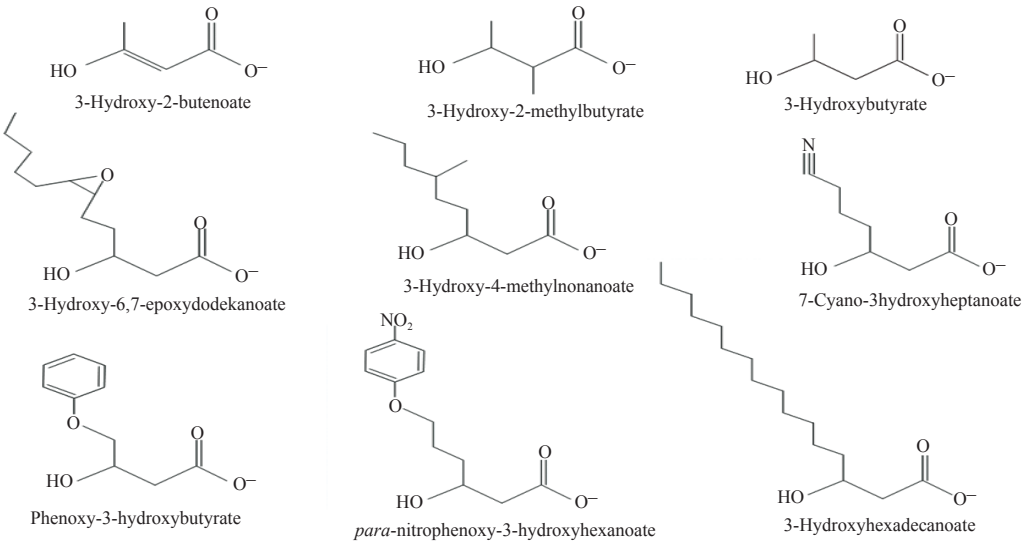
* Corresponding Author, Tel. 08-3190-8907, E-mail: pradinunt_eiamsaard@yahoo.com
DOI: 10.14416/j.kmutnb.2016.03.005
Received 3 February 2016; Accepted 23 March 2016; Published online: 16 September 2016
© 2017 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Presently, there is a high tendency of using products from petrochemical plastic in our daily life. This results in environmental effects particularly on the management of waste from production process as well as CO_2 emission. Consequently, to reduce the environmental problems, there have been many studies in finding substitution of petrochemical plastic with the same characteristics. This leads to biodegradable plastics especially Polyhydroxyalkanoates (PHAs) of which their material properties are closed to conventional petrochemical plastics; thus, they have been potentially applied in several types of manufacturing. This study focused on PHA biosynthesis produced by the potential bacterial strain yielding accumulative amount of PHA in the form of intracellular granules. With high needs of the industrial production of PHA, there have been many studies to improve species of micro-organisms using recombinant DNA technology and proper bacterial cultivation in order to gain high amount of PHA accumulation furthering to industrial production level at attractive values.

Keywords: Bioplastic, Polyhydroxyalkanoate, Bacteria

Please cite this article as: P. Eiamsa-ard, "Polyhydroxyalkanoate: Bioplastic from bacteria," *The Journal of KMUTNB.*, vol. 27, no. 1, pp. 147–158, Jan.–Apr. 2017 (in Thai).



รูปที่ 1 ตัวอย่างโครงสร้างโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของ PHA (ปรับปรุงจาก Rehm [4])

1. บทนำ

ปัจจุบันการสะสมของเสียที่เกิดจากการใช้พลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี (Petrochemical-based Plastic) เป็นปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญมาก ซึ่งส่งผลให้มีการศึกษาแนวทางในการหาวัสดุทางชีวภาพเพื่อนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ใช้กันมากในปัจจุบัน อาทิเช่น โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate) หรือ PHA จัดเป็นพลาสติกชีวภาพในกลุ่มโพลีเอสเทอร์ทางชีวภาพที่มีโครงสร้างแตกต่างกันตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นหน่วยย่อย [1], [2] โดยทั่วไปมักพบ PHA ชนิด Polyhydroxybutyrate (PHB) ซึ่งมีโครงสร้างไม่ซับซ้อนและเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ โดยโครงสร้างจะประกอบด้วยโมโนเมอร์ชนิดเดียว คือ 3-hydroxybutyrate (3-HB) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามีสารในกลุ่ม PHA มากกว่า 150 ชนิดที่มีความแตกต่างกันตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบดังแสดงตัวอย่างโครงสร้างในรูปที่ 1 ซึ่งมีผลให้ PHA แต่ละชนิดมีคุณลักษณะที่แตกต่างกัน [3], [4]

พลาสติกชีวภาพในกลุ่ม PHA สามารถจำแนกได้ด้วยขนาดความยาวของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างและสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรก คือ Short Chain Length PHAs (scl-PHAs) ประกอบด้วย PHA ที่มีความยาว C3-C5 ซึ่ง PHB จัดเป็นสารในกลุ่มนี้และยังเป็น PHA ตัวแรกที่มีการศึกษา [5] กลุ่มที่สอง คือ Medium Chain Length PHAs (mcl-PHAs) ประกอบด้วยคาร์บอนตั้งแต่ C6-C16 ตัวอย่างพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ Poly-3-hydroxyhexanoate; P(3HHx), Poly-3-hydroxyheptanoate; P(3HHp) และ Poly-3-hydroxyoctanoate; P(3HO) เป็นต้น สำหรับ PHA กลุ่มสุดท้าย คือ Long Chain Length PHAs (lcl-PHAs) เป็นกลุ่มของ PHA ที่มีความยาวมากกว่า 16 คาร์บอนอะตอม เช่น Poly-3-hydroxyhexadecanoate; P(3HHD) และ Poly-3-hydroxyoctadecanoate; P(3HOD) [6]

PHA มีคุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกันไปตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ เช่น มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 4.0×10^6 ดาลตัน จุดหลอมเหลว (Melting Point) ตั้งแต่ 60 ถึง 177 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความใกล้เคียงกับพลาสติกในกลุ่ม Polypropylene (PP) [7] ทั้งยังสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ด้วยกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์หลายชนิด จึงทำให้ PHA ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในระบบอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการใช้

ตารางที่ 1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่นำมาใช้ในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม

แบคทีเรีย	ชนิดของ PHA	อัตราการผลิต (ร้อยละต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	บริษัทผู้ผลิต
Ralstonia eutropha	PHB	>80%	Tianjin North Food, China
Alcaligenes latus	PHB	>75%	Chemie Linz,btF, Austria Biomers, Germany
Escherichia coli (recombinant)	PHB	>80%	Jiang Su Nan Tian, China
Ralstonia eutropha	PHBV	>75%	ICI, United Kingdom Zhejiang Tian An, China
Ralstonia eutropha	P3HB4HB	>75%	Metabolix, USA
Escherichia coli (recombinant)	P3HB4HB	>75%	Tianjin Green Biosci, China
Ralstonia eutropha	PHBHHx	>80%	P&G, Kaneka, Japan
Aeromonas hydrophila	PHBHHx	<50%	P&G, Jiangmen Biotech Ctr, China
Aeromonashydrophila (recombinant)	PHBHHx	>50%	Shandong Lukang, China
Pseudomas putida และ *P. oleovorans*	mcl-PHA	>60%	ETH, Switzerland
Bacillus spp.	PHB	>50%	Biocycles, Brazil

พลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี [2], [8] นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการนำพลาสติกชีวภาพในกลุ่ม PHA มาใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น การใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีกลุ่ม Fine Chemicals [9] และผลิตภัณฑ์กลุ่มบรรจุภัณฑ์และวัสดุเคลือบ (Packaging and Coating) [10] รวมทั้งการใช้เป็นตัวนำส่งยา [11] ในขณะเดียวกันเป็นที่น่าสนใจยิ่งเมื่อมีการรายงานความสามารถของสารในกลุ่ม PHA และอนุพันธ์ในการนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนทางชีวภาพอีกด้วย [12]

2. การสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรีย

พลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHA สามารถสังเคราะห์ได้ในกลุ่มแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งจะมีการสะสม PHA ภายในเซลล์แบคทีเรียในรูปของ Inclusion Granule โดยปกติการสะสม PHA ในเซลล์แบคทีเรียเป็นวิถีการสังเคราะห์ทางธรรมชาติในการสะสมแหล่งคาร์บอนและพลังงานเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้เจริญในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่สมดุล โดยเฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดแคลนหรือถูกจำกัดปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส [13] ถึงแม้ว่าจะมีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์ได้ แต่พบว่ามีเพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Cupriavidus necator* [14], *Alcaligenes latus* [15], *Azotobacter vinelandii* [16] และแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในสกุล *Methylotrophs* และ *Pseudomonas* [17], [18] โดยแสดงตัวอย่างสายพันธุ์แบคทีเรียที่ถูกนำมาใช้ผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมในตารางที่ 1 [2]

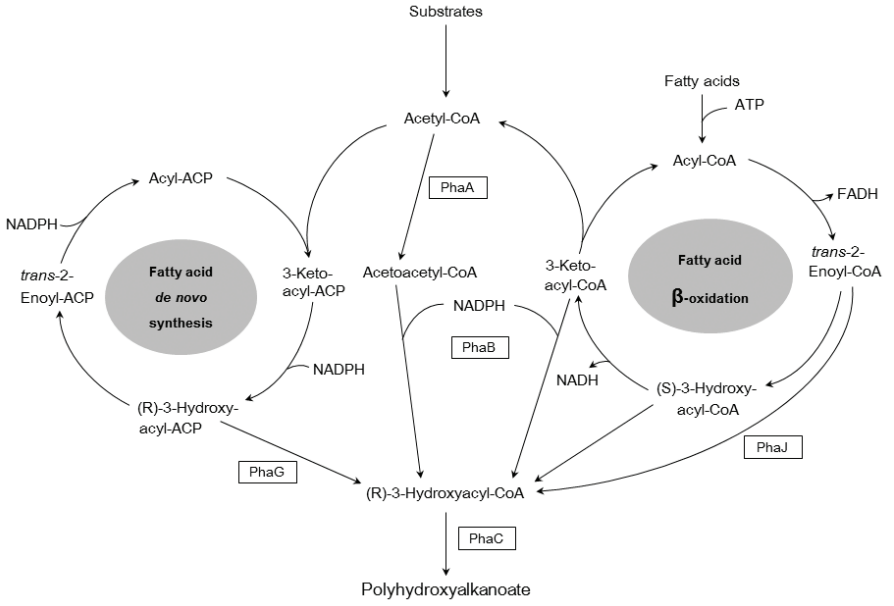
การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้มีการสะสม PHA ให้ได้ปริมาณมากภายในเซลล์นั้นสามารถทำได้ด้วยกระบวนการจัดการสภาวะการเพาะเลี้ยงไปจนถึงการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ นอกจากนี้ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิต PHA จากเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Substrate) ที่เหมาะสม [19] ตัวอย่างสารตั้งต้นที่ถูกนำมาใช้ในการผลิต PHA ของเซลล์แบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งเป็นการใช้แหล่งคาร์บอนหลายชนิดในการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพ แต่อย่างไรก็ตามการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ยังคงใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น เนื่องจากให้ปริมาณ PHA สูงกว่า เช่น บริษัท Tianjin North Food ในประเทศจีนสามารถผลิต Polyhydroxybutyrate (PHB) ได้สูงถึงร้อยละ 80

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการผลิต PHA ของเซลล์แบคทีเรียจากสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรีย	สารตั้งต้น
Cupriavidus necator	Waste Frying Oil [14]
	Oil Palm Frond (OPF) Juice [22]
	Sodium Glutamate [23]
	Waste Oils/Fats [24]
Alcaligenes latus	Palm Oil/Soymilk Waste Water [25]
	Bean Curd Waste [26]
	Sugarbeet Juice [15]
Pseudomonas putida	Glucose, Glycerol, Citrate, Fatty Acid [27]
	Condensed Corn Soluble, Glycerol, Soapstock [28]
Pseudomonas sp.	Waste Vegetable Oil [29]
Pseudomonas aeruginosa	Agro-industrial Oily Wastes [30]
Azotobacter vinelandii	Glucose [31]
	Sucrose [16]

ของน้ำหนักเซลล์แห้งจากการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน [2] นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA โดยไม่ใช้ออกซิเจนหรือใช้ออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเพื่อเป็นการลดต้นทุนในส่วนของการลดการใช้พลังงาน [20] ในขณะเดียวกันการสังเคราะห์ PHA ในปัจจุบันยังคงพบปัญหาด้านต้นทุนของการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์พลาสติกทางเคมี ซึ่งแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต PHA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกสำหรับเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต PHA โดยเฉพาะวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมและการเกษตร [21] ซึ่งมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่กล่าวถึงการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาผลิต PHA อาทิเช่น การใช้กลีเซลรอลซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. oleovorans* และ *P. corrugata* พบว่าสามารถผลิต PHB และ PHA ชนิด (mcl-PHA) ได้ในปริมาณมาก [32] การนำของเสียที่เกิดจากกระบวนการกลั่นน้ำมัน Rapeseed มาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA โดยใช้โพรพานอลเป็นสารตั้งต้นให้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Cupriavidus necator* เพื่อผลิตโคโพลีเมอร์ของ PHA ได้แก่ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [33] การใช้ Whey Lactose ซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากการผลิตอาหารสัตว์มาใช้ในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้เชื้อแบคทีเรียสามสายพันธุ์ ได้แก่ *Haloferax mediterranei*, *P. hydrogenovora* และ *Hydrogenophaga pseudoflava* [34]

นอกจากนั้นยังมีรายงานการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อใช้ในการผลิต PHA เช่น กากปาล์มที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน ชานอ้อย แกลบ ฟางข้าว ซังข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบที่กล่าวมานี้จัดเป็น Lignocellulosic Material อันประกอบไปด้วย ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสในอัตราส่วนที่แตกต่างกันไป [35] ในขณะเดียวกันมีรายงานวิจัยที่มีการนำวัตถุดิบในกลุ่มนี้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิต PHA หรืออนุพันธ์ของ PHA เช่น การใช้เมล็ดพลัม (Jambul Seed; *Syzygium cumini*) ในการผลิต PHA โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *R. eutropha* [36] และรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ไซโลส (Xylose) มาเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตพลาสติกชีวภาพ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. cepacia* สามารถผลิตอนุพันธ์ของ PHA ในรูปของ P(3HB-co-3HV) ได้ [37] นอกจากนี้ยังมีการวิจัยโดยการนำต้นหญ้าที่ใช้เป็นอาหารสัตว์มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต PHA จากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* โดยต้องทำการปรับสภาพของต้นหญ้าด้วยสาร NaOH ร่วมกับการใช้ความร้อน ซึ่งผลการทดลองพบว่าเชื้อสามารถผลิต PHA เพิ่มขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ [38]



รูปที่ 2 วิถีการสังเคราะห์ PHA ในเซลล์แบคทีเรีย (ปรับปรุงจาก Aldor and Keasling [40]) เอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์ถูกควบคุมด้วยชื่อยีนที่ปรากฏในสัญลักษณ์□ *PhaA*: 3-ketothiolase: *PhaB*: (R)-3-ketoacyl-CoA reductase, *PhaC*: PHA synthase or polymerase, *PhaG*: (R)-3-hydroxyacyl ACP:CoA transacylase, *PhaJ*: (R)-specific enoyl-CoA hydratase

3. การผลิต PHA โดยใช้แบคทีเรียตัดต่อพันธุกรรม (Recombinant Bacteria)

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าการสังเคราะห์โพลีเมอร์ชีวภาพชนิด PHA เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ Polyester Synthase หรือเรียกว่าเอนไซม์ PHA Synthase (ควบคุมการทำงานด้วยยีน *phaC*) ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นชนิด (R)-3-hydroxyacyl-CoA ให้เป็น PHA ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาชนิดของเอนไซม์ PHA Synthase ที่แตกต่างกันมากกว่า 88 ชนิด และพบว่าเอนไซม์ Polyester Synthase ถูกจัดเป็นเอนไซม์กลุ่มใหม่ที่ได้รับความสนใจมาก เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงต่อการสังเคราะห์ PHA Granules ภายในเซลล์แบคทีเรียหลายชนิด [39]

กระบวนการสังเคราะห์ PHA จะเกิดขึ้นโดยผ่าน 3 วิถีการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 2 [4], [40] ได้แก่ วิถีการสังเคราะห์ผ่านเมแทบอลิซึมของคาร์บอนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ β-ketothiolase (ควบคุมการทำงานด้วยยีน *phaA*) ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น acetyl-CoA ให้เป็น acetoacetyl-CoA ซึ่งถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น (R)-3-hydroxyacyl-CoA ด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase (ควบคุมการทำงานด้วยยีน *phaB*) [41], [42] ในขณะที่วิถีการสังเคราะห์โดยผ่านกระบวนการ β-oxidation และ fatty acid de novo synthesis pathway พบในการสังเคราะห์ PHA ชนิด Medium Chain Length (mcl-PHA) โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* ซึ่งเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ (R)-specific enoyl-CoA hydratase (ควบคุมด้วยยีน *PhaJ*) และ 3-hydroxyacyl-ACP; CoA Transferase ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *PhaG* ตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสารตัวกลางให้เป็นสารตั้งต้นของ PHA ต่อไป [43]–[45]

ปัจจุบันมีการเลือกใช้เชื้อแบคทีเรียตัดต่อพันธุกรรม (Recombinant Bacterial Cell) กันอย่างกว้างขวางสำหรับการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งทำให้สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อคุณสมบัติของ PHA เช่น ชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบและความยาวของสายโพลีเมอร์ รวมไปถึงปริมาณผลผลิตที่ได้ นอกจากนี้การสังเคราะห์ PHA โดยอาศัยการตัดต่อยีนซึ่งมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในวิถีการสังเคราะห์ ส่งผลให้มีโอกาสได้ผลผลิตที่เป็นโพลีเมอร์ชนิดใหม่ๆ โดยอยู่ภายใต้เงื่อนไขของการสังเคราะห์แบบต้นทุนต่ำแต่ให้ผลผลิตสูง [40], [46] แบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Host Cell) ในการสังเคราะห์ PHA ด้วยการใช้เทคโนโลยีการตัดต่อพันธุกรรม (Genetic Engineering) ตัวอย่างเช่น *R. eutropha*, *P. putida*, *P. oleovorans*, *C. necator* หรือแม้กระทั่ง *E. coli* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ยังไม่มีการรายงานถึงความสามารถในการสะสม PHA [47] ขณะเดียวกันการใช้เทคโนโลยีการตัดต่อพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก และพบว่ามีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่นิยมนำมาพัฒนาสายพันธุ์เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิต PHA อาทิเช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ซึ่งปกติไม่สามารถสะสม PHB ได้ แต่เมื่อได้รับการถ่ายยีน *phaCAB* จากเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* จะทำให้สามารถสังเคราะห์ PHB ได้ [48] นอกจากนั้นการแสดงออกของยีน *phaC* แบบ Over Expression ในแบคทีเรีย สายพันธุ์ *Alcaligenes latus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ได้จะช่วยให้เซลล์สามารถสะสม PHB ในปริมาณสูงขึ้น [49] การศึกษาการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Burkholderia* sp. จำนวน 4 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA ได้แก่ PHA synthase (*phaC*), β-ketothiolase (*phaA*), acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*) และ PHA synthesis regulator (*phaR*) ซึ่งเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียสายพันธุ์ *C. necator* พบว่ามีการสะสม PHA ชนิดโคโพลิเมอร์ (co-polymer) ที่ไม่พบการสะสมในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Burkholderia* sp. เช่น poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [50]

ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่ไม่พบรายงานการผลิต PHA เช่น *E. coli* สามารถนำมาผลิตอนุพันธ์ของ PHA ได้จากการใช้เทคโนโลยี (Genome Project) จึงทำให้ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจต่อการนำมาใช้ในการผลิต PHA เป็นอย่างมาก [40] รายงานวิจัยการใช้ *E. coli* ในการผลิต PHA เป็นครั้งแรกด้วยการศึกษาการแสดงออกของยีน (Gene Expression) ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHB ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* [51] ต่อมามีรายงานวิจัยอีกจำนวนมากที่กล่าวถึงการใช้ Recombinant *E. coli* ในการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHA เช่น การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ PHB จากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* ใน *E. coli* พบว่า Recombinant *E. coli* สามารถสะสม PHB ในปริมาณมากเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ Yeast Extract และ Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน [52] นอกจากนี้ ผลการวิจัยของ Lee แสดงให้ทราบว่า *E. coli* สามารถสะสม (R)-3-hydroxybutyric acid (R3HB) โดยการได้รับยีนในกลไกการสังเคราะห์ PHA จากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* ในสภาวะ การเพาะเลี้ยงที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน [53] ขณะที่การแสดงออกของยีน *butyrate kinase* (*Buk*) และ *phosphotransbutyrylase* (*Ptb*) แยกจากเชื้อแบคทีเรีย Clostridium acetobutylicum และอีกสองยีน *phaE* และ *phaC* ที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ PHA Synthase จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Thiocapsa pfennigii* โดยให้ *E. coli* ทำหน้าที่ใน การสังเคราะห์ PHA จากการใช้กรดไขมันชนิด Hydroxyl Fatty Acids เป็นสารตั้งต้น พบว่าเชื้อสามารถสังเคราะห์โพลีเมอร์ชนิด 3-hydroxybutyrate (3HB), 4-hydroxybutyrate (4HB), และ 4-hydroxyvalerate (4HV) ซึ่งสอดคล้องกับชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต [54] การศึกษาการแสดงออกของกลุ่มยีน *phaECHme* ซึ่งควบคุมการผลิต poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) ที่แยกจากแบคทีเรียสายพันธุ์

Haloferax mediterranei โดยใช้ recombinant *E. coli* [55] นอกจากนี้ยังพบ การแสดงออกของยีน *phaC* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเชื่อมต่อโพลิเมอร์ในโครงสร้างของ PHA ร่วมกับยีนอื่นๆ ในวิถีการสังเคราะห์ ซึ่งสามารถแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Chromobacterium* sp. พบว่า Recombinant *E. coli* สามารถสะสม PHA ได้สูงกว่าการสะสมในแบคทีเรียสายพันธุ์ *C. necator* ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมได้ถึง 8 เท่า [56]

4. สรุป

เนื่องด้วยปัจจุบันสภาวะด้านสิ่งแวดล้อมจัดเป็นปัญหาที่สำคัญและได้รับความสนใจจากทุกภาคส่วน โดยเฉพาะปัญหาการสะสมขยะพลาสติก รวมทั้งปัญหาการขาดแคลนทรัพยากรน้ำมันซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตพลาสติก จึงทำให้เกิดการศึกษาเพื่อหาแนวทางการนำพลาสติกชีวภาพมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น ทั้งยังมีการพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพได้มีศักยภาพในการผลิตเพื่อตอบสนองต่อความต้องการในปัจจุบันนอกจากการหาสภาวะการเพาะเลี้ยงและชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA แล้ว ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ยังจำเป็นต้องพิจารณาถึงต้นทุนการผลิตให้เหมาะสมอีกด้วย ซึ่งทางเลือกหนึ่งก็คือการเลือกใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรหรืออุตสาหกรรมต่างๆ มาเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม แต่ในทางกลับกันอาจนำไปสู่การใช้ต้นทุนที่สูงขึ้นในขั้นตอนของการเก็บเกี่ยว PHA ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงแนวทางในการผลิต PHA ให้มีประสิทธิภาพและไม่ก่อให้เกิดปัญหาในขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์เมื่อผลิต PHA จากวัสดุเหลือทิ้ง อันได้แก่ การใช้จุลินทรีย์ตัดต่อพันธุกรรมซึ่งปัจจุบันพบว่ามีรายงานวิจัยจำนวนมากที่ได้อภิปรายถึงขีดความสามารถในการผลิต PHA และอนุพันธ์โดยการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์โดยใช้จุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งนับว่าเป็นเทคโนโลยีที่ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] G. Q. Chen and Q. Wu, "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials," *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6565–6578, November, 2005.

[2] G. Q. Chen, "A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry," *Chemical Society Reviews*, vol. 38, no. 8, pp. 2434–2446, August, 2009.

[3] S. F. Williams, D. P. Martin, D. M. Horowitz, and O. P. Peoples, "PHA applications: Addressing the price performance issue: I. Tissue engineering," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 25, no. 1–3, pp. 111–21, June, 1999.

[4] B. H. A. Rehm, "Polyester synthases: Natural catalysts for plastics," *Biochemical Journal*, vol. 376, no. 376, pp. 15–33, November, 2003.

[5] M. Lemoigne, "Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide ß-oxobutyrique," *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique*, vol. 8, pp. 770–782, 1926.

[6] A. Steinbüchel and U. Pieper, "Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 37, no. 1, pp. 1–6, April, 1992.

[7] G. Braunegg, G. Lefebvre, and K. F. Genser, "Poly-hydroxyalkanoates, biopolymer from renewable sources: Physiological and engineering aspects," *Journal of Biotechnology*, vol. 65, no. 2, pp. 127–161, November, 1998.

[8] K. Numata, H. Abe, and T. Iwata, "Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) materials," *Materials*, vol. 2, no. 3, pp. 1104–1126, August, 2009.

[9] X. Gao, J. C. Chen, Q. Wu, and G. C. Chen, "Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, no. 6, pp. 768–774, December, 2011.

[10] D. Z. Bucci, L. B. B. Tavares, and I. Sell, "PHB packaging for the storage of food products," *Polymer Testing*, vol. 24, no. 5, pp. 564–571, August, 2005.

[11] S. J. Park, J. I. Choi, and S. Y. Lee, "Short-chain-length polyhydroxyalkanoates: Synthesis in metabolically engineered escherichia coli and medical applications," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 206–215, February, 2005.

[12] X. J. Zhang, R. C. Luo, Z. Wang, Y. Deng, and G. Q. Chen, "Application of (R)-3-Hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 4, pp. 707–711, April, 2009.

[13] L. Shang, M. Jiang, and H. N. Chang, "Poly (3-hydroxy-butyrate) synthesis in fed-batch culture of Ralstonia eutropha with phosphate limitation under different glucose concentration," *Biotechnology Letter*, vol. 25, no. 17, pp. 1415–1419, September, 2003.

[14] R. A. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, Z. Piotrowska-Seget, and I. K. Radecka, "Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*," *AMB Express*, vol. 11, no. 1, pp. 1–8, June, 2011.

[15] B. Wang, R. R. Sharma-Shivappa, J. W. Olson, and S. A. Khan, "Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice," *Industrial Crops and Products*, vol. 43, pp. 802–811, May, 2013.

[16] A. García, D. Segura, G. Espín, E. Galindo, T. Castillo, and C. Peña, "High production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 82, pp. 117–123, January, 2014.

[17] C. Guo-Qiang, X. Jun, Q. Qiong, Z. Zeng-ming, and H. Kwok-Ping, "Synthesis of co-polyesters consisting of medium-chainlength β-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 48, no. 1–3, pp. 107–112, May, 2001.

[18] R. D. Ashby, D. K. Solaiman, and T. A. Foglia, "The synthesis of short- and medium-chainlength poly(hydroxyalkanoates) mixtures from glucose or alkanoic acid grown *Pseudomonas oleovorans*," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 28, pp. 147–153, March, 2002.

[19] C. E. Rodríguez, J. Bastida, and A. Manresa, "Utilization of agro-industrial residues for poly(3-hydroxyalkanoate) production by *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (NCIMB 40045): Optimization of culture medium," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 89, no. 1, pp. 111–122, January, 2012.

[20] X. X. Wei, Z. Y. Shi, M. Q. Yuan, and G. Q. Chen, "Effect of anaerobic promoters on the microaerobic production of polyhydroxybutyrate (PHB) in recombinant *Escherichia coli*," *Applied Genetics And Molecular Biotechnology*, vol. 82, no. 4, pp. 703–712, March, 2008.

[21] P. I. Nikel, A. de Almeida, E. C. Melillo, M. A.

Galvagno, and M. J. Pettinari, "New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of Poly(3-Hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, pp. 3949–3954, June, 2006.

[22] M. A. K. M. Zahari, H. Ariffin, M. N. Mokhtar, J. Salihon, Y. Shirai, and M. A. Hassan, "Factors affecting poly(3-hydroxybutyrate) production from oil palm frond juice by *Cupriavidus necator* (CCUG52238T)," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, pp. 1–8, July, 2012.

[23] N. Berezina, "Novel approach for productivity enhancement of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Cupriavidus necator* DSM 545," *New Biotechnology*, vol. 30, no. 2, pp. 192–195, January, 2013.

[24] S. Povolo, M. Basaglia, F. Fontana, A. Morelli, and S. Casellaa, "Poly(hydroxyalkanoate) production by *Cupriavidus necator* from fatty waste can be enhanced by phaZ1 inactivation," *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, vol. 29, no. 2, pp. 67–74, April, 2015.

[25] C. Thammawong, K. Thongkhong, K. Iamtassana, A. Sharp, and P. Opaprakasit, "Production and characterization of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from inexpensive substrates by *Alcaligenes latus*," *Advanced materials research*, vol. 55–57, pp. 893–896, August, 2008.

[26] S. Kumalaningsih, N. Hidayat, and N. Aini, "Optimization of Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from liquid bean curd waste by *Alcaligenes latus* bacteria," *Journal of Agriculture and Food Technology*, vol. 1, no. 5, pp. 63–67, 2011.

[27] G. Wang and C. T. Nomura, "Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas* putida KT2440 grown on different carbon sources," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 110, no. 6, pp. 653–659, December, 2010.

[28] J. Javers and C. Karunanithy, "Polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas putida* KT217 on a condensed corn solubles based medium fed with glycerol water or sunflower soapstock," *Advances in Microbiology*, vol. 2, pp. 241–251, September, 2012.

[29] J. H. Song, C. O. Jeon, M. H. Choi, S. C. Yoon, and W. Park, "Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas* sp. strain DR2," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 18, no. 8, pp. 1408–1415, March, 2008.

[30] D. Fernández, E. Rodríguez, M. Bassas, M. Vinas, A. M. Solanas, J. Llorens, A. M. Marqués, and A. Manresa, "Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 26, pp. 159–167, November, 2005.

[31] O. Rojas-Rosas, J. Villafaña-Rojas, F. A. López-Dellamary, J. Nungaray-Arellano, and O. González-Reynoso, "Production and characterization of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 from glucose, an unrelated carbon source," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 53, no. 7, pp. 840–851, August, 2007.

[32] R. D Ashby, D. K. Y. Solaiman, and T. A. Foglia. "Synthesis of short-/medium-chain-length

Poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 4, pp. 2106–2112, April, 2005.

[33] S. Obruca, I. Marova, O. Snajdar, L. Mravcova, and Z. Svoboda, "Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate," *Biotechnology Letters*, vol. 32, no. 12, pp. 1925–1932, August, 2010.

[34] M. Koller, A. Atlić, Y. Gonzalez-Garcia, C. Kutscherac, and G. Braunegg, "Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from whey lactose," *Macromolecular Symposia*, vol. 272, pp. 87–92, November, 2008.

[35] M. Koller, A. Atlić, M. Dias, A. Reiterer, and G. Braunegg, "Microbial PHA production from waste raw materials. in: Plastics from bacteria: natural functions and applications," *Microbiology Monographs*, vol. 14, pp. 85–119.

[36] R. Preethi, P. Sasikala, and J. Aravind, "Microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) utilizing fruit waste as a substrate," *Research in Biotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 61–69, January, 2012.

[37] T. M. Keenan, J. P. Nakas, and S. W. Tanenbaum, "Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 33, no. 616, pp. 616–626, July, 2006.

[38] R. Davis, R. Kataria, F. Cerrone, T. Woods, S. Kenny, and A. O'Donovan, et al., "Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by Pseudomonas strains," *Bioresource Technology*, vol. 150, pp. 202–209, December, 2013.

[39] B. H. A. Rehm, "Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: A platform technology for the production of tailor-made bioparticles," *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 9, no. 1, pp. 41–62, January, 2007.

[40] I. S. Aldor and J. D. Keasling, "Process design for microbial plastic factories: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, no. 5, pp. 475–483, October, 2003.

[41] O. P. Peoples, and A. J. Sinskey, "Poly-betahydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in Alcaligenes eutrophus H16; Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC)," *The Journal of Microbiological Chemistry*. vol. 264, no. 26, pp. 15298–15303, Januaury, 1989.

[42] T. Tsuge, K. Yano, S. Imazu, K. Numata, Y. Kikkawa, H. Abe, K. Taguchi, and Y. Doi, "Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases," *Macromolecular Bioscience*, vol. 5. pp. 112–117, February, 2005.

[43] W. J. Page and J. Manchak, "The role of b-oxidation of short-chain alkanoates in polyhydroxyalkanoate copolymer synthesis in *Azotobacter vinelandii* UWD," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 41, no. 13, pp. 106–114, December, 1995.

[44] B. H. A. Rehm, N. Kruger, and A. Steinbüchel, "A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The phaG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase," *The Journal of Microbiological Chemistry*, vol. 273, no. 37,

pp. 24044–24051, September, 1998.

[45] A. Steinbüchel and T. Lütke-Eversloh, Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 5, pp. 81–96, November, 2003.

[46] R. Li, H. Zhang, and Q. Qi, "The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*," *Bioresource Technology*. vol. 98, pp. 2313–2320, November, 2006.

[47] S. Y. Lee and J. Choi, "Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms," *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 71, pp. 183–207, May, 2001.

[48] A. Steinbüchel and P. Schubert, "Expression of the Alcaligenes eutrophus poly(ß-hydroxybutyric acid)-synthetic pathway in *Pseudomonas* sp.," *Archives of Microbiology*, vol. 153, no. 1, pp. 101–104, December, 1989.

[49] S. Y. Lee, J. Choi, and S. H. Lee, "Production of polyhydroxyalkanoates by fermentation of bacteria," *Macromolecular Symposium*, vol. 159, no. 1, pp. 259–266, October, 2000.

[50] N. S. Lau and K. Sudesh, "Revelation of the ability of *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050) PHA synthase to polymerize 4-hydroxybutyrate monomer," *AMB Express*, vol. 2, no. 41, pp. 1–9, August, 2012.

[51] P. Schubert, A. Steinbuchel, and H. G. Schlegel, "Cloning of the Alcaligenes eutrophus genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, vol. 170, no. 12, pp. 5837–5847, December, 1988.

[52] L. H. Mahishi, G. Tripathi, and S. K. Rawal, "Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: Effect of various carbon and nitrogen sources," *Microbiological Research*, vol. 158, 19–27, July, 2003.

[53] S. Y. Lee and Y. Lee, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)-(-)-Hydroxycarboxylic acids," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 6, pp. 3421–3426, June, 2003.

[54] S. J. Liu and A. Steinbüchel, "A novel genetically engineered pathway for synthesis of Poly(hydroxyalkanoic acids) in *Escherichia coli*," *Applied and Environmntal Microbiology*, vol. 66, no. 2, pp. 739–743, February, 2000.

[55] Q. Lu, J. Han, L. Zhou, J., Zhou, and H. Xiang, "Genetic and biochemical characterization of the Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*," *Journal of Bacteriology*, vol. 190, pp. 4173–4180, June, 2008.

[56] K. Bhubalan, J. A. Chuah, F. Shozui, C. J. Brigham, S. Taguchi, A. J. Sinskey, C. Rha, and K. Sudesh, "Characterization of the highly active polyhydroxyalkanoate synthase of *Chromobacterium* sp. strain USM2," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 9, pp. 2926–2933, May, 2011.