

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากอัลคาลิเจเนส ยูโทรฟัส และการประยุกต์ใช้

Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by *Alcaligenes eutrophus* and Its Application

ศศิธร สอนน้า^{1*} เทวัญ หยุ่น² นิษา ไพจิตร² และกนกพร สังขรักษ์³

Sasithorn Sonnam^{1*}, TewanYunu², Nisa Paichid² and Kanokphorn Sangkharak³

บทคัดย่อ

ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้ออัลคาลิเจเนส ยูโทรฟัสและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต คือ กากน้ำตาล จุลินทรีย์จะมีการเจริญ และผลิตเซลล์ได้สูงสุด (4.16 กรัมต่อลิตร) ผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 2.35 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 56.49 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ภายในระยะเวลา 108 ชั่วโมง สำหรับสภาวะการหมักที่เหมาะสมคือการหมักแบบกะจุลินทรีย์จะมีการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูง (54.69 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ขณะที่การหมักแบบกึ่งกะจะได้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเพียง 38.43 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง พอลิเมอร์ที่สกัดได้สามารถระบุว่าเป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยการศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี และแก๊สโครมาโทกราฟีโดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ได้สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮดรอกซีบิวทิเรตเมทิลเอสเทอร์ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายไบโอดีเซล

คำสำคัญ : พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ อัลคาลิเจเนส ยูโทรฟัส

¹ นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

² นักวิชาชีฟ, ³ ผศ.ดร., สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

* Corresponding author: e-mail: ssnewsn5@gmail.com

Abstract

The suitable carbon source for the growth of *Alcaligenes eutrophus* and polyhydroxybutyrate production was molasses. The highest cell growth (4.16 g/L) and polyhydroxybutyrate (2.35 g/L, 56.49% of dry cell weight) was obtained from molasses after 108 h of cultivation. Afterwards, the effect of fermentation condition was studied. Batch fermentation yielded the highest cell growth and polyhydroxybutyrate (54.69% of dry cell weight). While only 38.43% of polyhydroxybutyrate was obtained under fed-batch fermentation. The isolated polymer was characterized for chemical composition by Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Gas Chromatography. The obtained polymer was similar to polyhydroxybutyrate in comparing with commercial polyhydroxybutyrate. Isolated polyhydroxybutyrate was utilized as substrate for hydroxybutyrate methyl ester. Interestingly, the chemical composition of hydroxybutyrate methyl ester was similar to biodiesel.

Keywords : Polyhydroxybutyrate, Polyhydroxyalkanoate, *Alcaligenes Eutrophus*

บทนำ

ปัจจุบันนี้ผลิตภัณฑ์จากพลาสติกสังเคราะห์เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันของมนุษย์เพิ่มมากขึ้น และยังคงมีแนวโน้มในการประยุกต์ใช้ไปอีกเป็นระยะเวลานาน โดยเฉพาะการใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ที่มีระยะเวลาการใช้งานสั้น เช่น ถังพลาสติก พลาสติกห่ออาหาร และกล่องโฟม เป็นต้น ก่อให้เกิดเป็นวัสดุเหลือทิ้งในชุมชนและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก เนื่องจากพลาสติกสังเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี อยู่ในรูปของพอลิโพรพิลีน พอลิเอทิลีนและพอลิไวนิลคลอไรด์ เป็นต้น ซึ่งเกิดการย่อยสลายได้ยาก ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่จึงมักมีการกำจัดพลาสติกเหล่านี้ด้วยการฝังกลบ วิธีนี้จะใช้เวลานานกว่าร้อยละ 100 กว่าพลาสติกจะมีการย่อยสลายได้หมด หรือการเผาทำลาย ซึ่งจะส่งผลให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นอยู่ในชั้นบรรยากาศมากเกินไปจนความร้อนจากพื้นโลกไม่สามารถสะท้อนออกนอกโลกได้ ทั้งหมดล้วนก่อให้เกิดความแปรปรวนของสภาวะอากาศอย่างรุนแรงทั่วโลก ดังนั้นจึงมีแนวทางที่จะลดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม โดยมีการนำพลาสติกสังเคราะห์มาใช้ซ้ำ หรือเลือกบรรจุภัณฑ์ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้ทางธรรมชาติหรือพลาสติกชีวภาพเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากพลาสติกชีวภาพสามารถสลายตัวได้ด้วยการทำงานของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา หรือสาหร่ายต่าง ๆ ในระยะเวลาไม่นาน จึงไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม [1] โดยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate : PHB) จัดอยู่ในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA) ถูกค้นพบโดย Maurice Lemoigne เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 ณ สถาบันปาสเตอร์ กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็น พอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่งที่สามารถสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Alcaligenes eutrophus*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium* และ *Azotobacter beijerinckii* เป็นต้น [2-4] แบคทีเรียจะสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองในสภาวะที่มีอาหารจำกัด [5] ในปัจจุบันพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตถูกนำมาใช้งานในด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและอื่น ๆ เมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบว่าพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสามารถใช้เป็นวัตถุดิบที่สามารถผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพชนิดใหม่คือไฮดรอกซีบิวทิเรตเมทิลเอสเทอร์ [Hydroxybutyrate methyl ester (HBME)] ได้ [6] ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีความสนใจในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อจุลินทรีย์ *A. eutrophus* และศักยภาพในการนำพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไฮดรอกซีบิวทิเรตเมทิลเอสเทอร์

วัสดุและวิธีการ

1. จุลินทรีย์ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* สายพันธุ์ TISTR 1095 จากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยขยายหัวเชื้อลงในอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) ที่ประกอบด้วย Agar, Beef extract และ Peptone บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชยเชื้อ *A. eutrophus* บนอาหารแข็งจำนวน 1 ลูกโป่ง ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ที่ประกอบด้วย Beef extract และ Peptone ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *A. eutrophus*

2.1 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ และการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *A. eutrophus* เติมหักเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหาร NB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ดังนี้ กาบน้ำตาล ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เติมหักเชื้อเท่ากับ 7 จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณกาบน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Phenol-sulfuric method [7] รวมถึงวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์และปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้

2.2 การศึกษาผลของวิธีการหมักที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *A. eutrophus* เติมหักเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหาร NB ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (ผลจากการทดลอง 2.1) ทำการเลี้ยง *A. eutrophus* แบบไม่ต่อเนื่อง (Batch) และแบบกึ่งต่อเนื่อง (Fed batch) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีโดยไม่ทำการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างในกระบวนการหมักโดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์และปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้

3. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ได้จะนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของปริมาณ (กรัมต่อลิตร) ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามวิธีการของปิยาภรณ์ และคณะ [8] นอกจากนี้วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy และ Gas chromatography โดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

4. การเตรียมไฮดรอกซีบิวทิเรต เมทิลเอสเทอร์จากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

นำพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตปริมาณ 1.5 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่มีตัวเร่งปฏิกิริยากรดซัลฟูริก 15 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย ทำการรีฟลักซ์เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายที่เย็นแล้ว เขย่าให้ส่วนผสมแยกชั้นกัน นำส่วนของชั้นสารละลายอินทรีย์ไปทำการระเหยเอาคลอโรฟอร์มและเมทานอลที่เหลือบางส่วนออกภายใต้สุญญากาศ [9] ตรวจสอบปริมาณกรดไขมันด้วยวิธีการไทเทรตตามมาตรฐาน AOCS Official method Ca-5a-40 และหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วย GC (อ้างอิงวิธีการทดสอบ WI-RES-GC-01)

ผลการวิจัยและอภิปราย

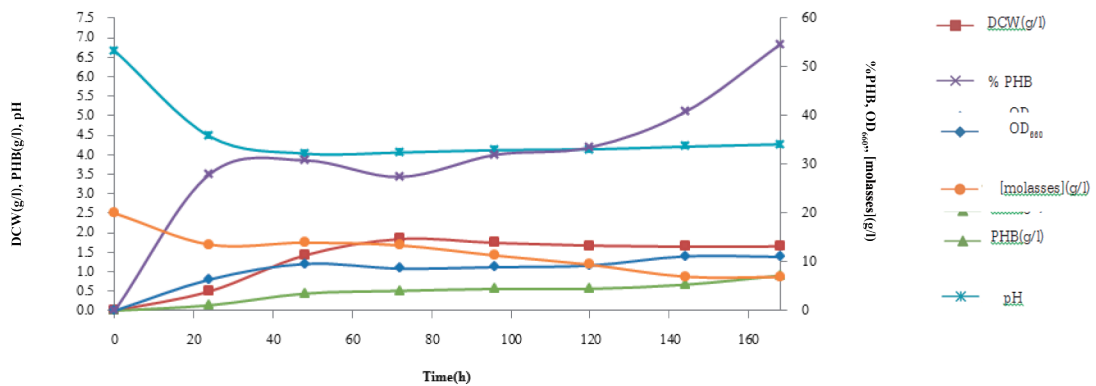
1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ *A. eutrophus*

กล้าเชื้อจุลินทรีย์ *A. eutrophus* สายพันธุ์ TISTR 1095 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มีลักษณะโคโลนีกลมมน สีเหลืองอ่อน โดยเชื้อ *A. eutrophus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบพวก facultative มีรูปร่างเป็นแท่งกว้างประมาณ 0.5 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1.8-2.6 ไมโครเมตร มีสีขาวหรือครีม หากมีอายุหลายวันจะเป็นสีน้ำตาล อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส ถิ่นอาศัยคือในดินและในน้ำ [10] สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ในเซลล์ได้มากถึงร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์ โดยการใช้แหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ [11]

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *A. eutrophus*

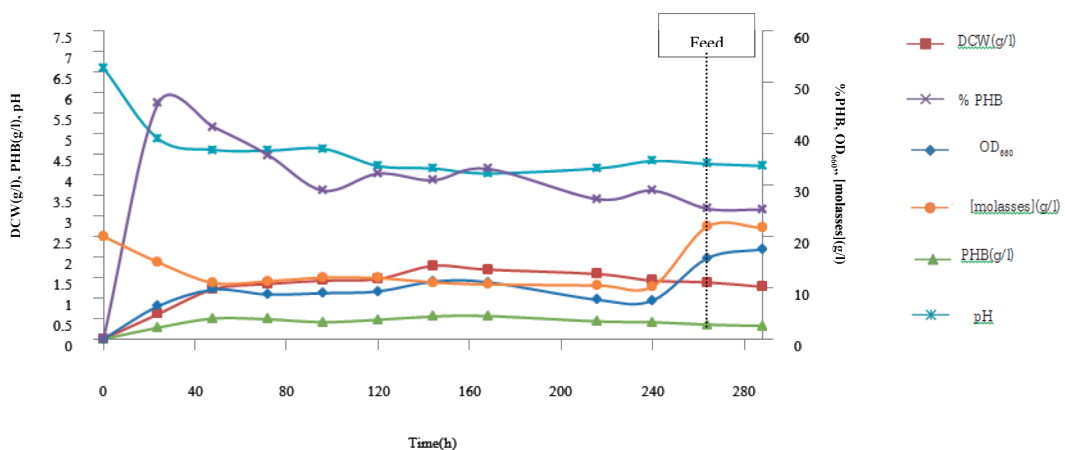
2.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *A. eutrophus* การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *A. eutrophus* ทำการทดลองโดยการเตรียมอาหารเหลว NB ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ กากน้ำตาล ซูโครส ฟรุคโตส และกลูโคส ที่ความเข้มข้นคือ 20 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *A. eutrophus* จะเจริญ และให้ปริมาณเซลล์สูงสุด (4.16 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับผลผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 2.35 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 56.49 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในช่วงเวลาที่ 108 ของการหมัก ซึ่งสูงกว่าการใช้ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Beulieu et al. [12] ที่ได้มีการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *A. eutrophus* จากแหล่งคาร์บอนกลูโคสและกากน้ำตาล พบว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจะเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้มากกว่ากลูโคสถึง 9 เปอร์เซ็นต์

2.2 การศึกษากระบวนการหมักที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *A. eutrophus* การหมักจุลินทรีย์ *A. eutrophus* ในสภาวะปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ลิตร ที่มีกากน้ำตาลเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร เลี้ยงในอุณหภูมิห้อง อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที โดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณออกซิเจน ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าในการเลี้ยงแบบกะ ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ *A. eutrophus* ปริมาณของกากน้ำตาลลดลงอย่างชัดเจนจาก 20 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 13.57 กรัมต่อลิตร โดยหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง ปริมาณของกากน้ำตาลค่อย ๆ ลดลง และในช่วงเวลาที่ 168 ปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 6.90 กรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.84 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลาที่ 72 และมีความเข้มข้นของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 0.90 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลาที่ 168 ซึ่งมีการสะสมของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 54.69 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 ปริมาณคาร์บอน (กรัมต่อลิตร), พีเอช, ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร), ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (กรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง) จาก *A. eutrophus* เมื่อทำการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบกะ

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง พบว่าปริมาณคาร์บอนจะค่อย ๆ ลดลงจาก 20 กรัมต่อลิตร จนเหลือ 10.26 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 264 ของการหมัก จากนั้นจึงทำการเติมแหล่งคาร์บอนเพิ่มให้เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตรอีกครั้ง สำหรับผลผลิตเซลล์ที่ได้คือ 1.38 กรัมต่อลิตร ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 0.53 กรัมต่อลิตร คิดเป็นความเข้มข้นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 38.43 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะถึง 1.42 เท่า (ภาพที่ 2) การหมักแบบกึ่งกะ คือการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะ ๆ ทั้งนี้ในกระบวนการหมักซึ่งใช้ระยะเวลาสั้นกว่าแบบกะ อาจเกิดการผลิตและสะสมสารพิษหรือสารที่มีผลยับยั้งการเจริญหรือการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จึงทำให้ได้ปริมาณเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตต่ำ [13-14]



ภาพที่ 2 ปริมาณคาร์บอน (กรัมต่อลิตร), พีเอช, ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร), ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (กรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง) จาก *A. eutrophus* เมื่อทำการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งกะ

3. การวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

พอลิเมอร์ที่สกัดได้จาก *A. eutrophus* จะถูกนำมาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) โดยทำการเปรียบเทียบโครงสร้างพอลิเมอร์ที่สกัดได้ด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้าดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แถบข้อมูลการดูดกลืนแสงที่สำคัญของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้าและพอลิเมอร์จาก *A. eutrophus*

ประเภทการสั่น	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า	พอลิเมอร์จาก <i>A. eutrophus</i>
O-H Stretching (cm-1)	-	3253
CH ₃ Stretching (cm-1)	2973	2967
CH ₂ Stretching (cm-1)	2930	2928
C=O Stretching (cm-1)	1720	1720
C-O Stretching (cm-1)	1275, 1129, 1043	1275, 1129, 1045

การยืนยันโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์ *A. eutrophus* ด้วยเทคนิค ATR-FTIR ผลปรากฏว่าเป็นพอลิเมอร์ชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยทำการเปรียบเทียบกับโครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า ซึ่งสอดคล้องกับการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งพบว่าพอลิเมอร์ที่สกัดได้มีพีคของ hydroxybutyric acid ที่ retention time เท่ากับ 8.33 นาที ซึ่งตรงกับพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า

4. การวิเคราะห์ไฮดรอกซี เมทิล เอสเทอร์ที่ได้จากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *A. eutrophus*

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้ปริมาณ 1.5 กรัม เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทานอลใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดซัลฟูริก 15 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) 20 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จะได้ไฮดรอกซี เมทิลเอสเทอร์ปริมาตร 13 มิลลิลิตร โดยไฮดรอกซีเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จะมีสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ไฮดรอกซีบิวทิเรต เมทิลเอสเทอร์จากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *A. eutrophus*

จากนั้นทำการวิเคราะห์ไบโอดีเซลโดยใช้เทคนิค ATR-FTIR เพื่อเป็นการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ เมทิลเอสเทอร์ พบว่ามีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับไบโอดีเซล (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 หมู่ฟังก์ชันของไฮดรอกซีบิวทิเรต เมทิลเอสเทอร์ จากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *A. eutrophus* และไบโอดีเซล ที่วิเคราะห์โดยวิธี ATR-FTIR

ประเภทการสั่น	HBME จากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากเชื้อ <i>A. eutrophus</i>	ไบโอดีเซลจาก น้ำมันปาล์ม [16]
O-H Stretching (cm-1)	3340	2500-3300
CH ₃ Stretching (cm-1)	2939	-
CH ₂ Stretching (cm-1)	2833	724
C=O Stretching (cm-1)	1642	1740
C-O Stretching (cm-1)	1180,1004	1171, 1207

การตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระของไฮดรอกซี เมทิล เอสเทอร์ที่ได้ด้วยวิธีการไทเทรตตามมาตรฐาน AOCS Official method Ca-5a-40 เทียบกับ ไบโอดีเซล และไฮดรอกซีเมทิลเอสเทอร์ที่ใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้าเป็นวัตถุดิบ พบว่าไฮดรอกซีเมทิลเอสเทอร์ที่ใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้าเป็นวัตถุดิบมีปริมาณกรดไขมันอิสระเท่ากับ 1.590 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม ในขณะที่ใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *A. eutrophus* เป็นวัตถุดิบจะมีปริมาณกรดไขมันอิสระเท่ากับ 1.173 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม ซึ่งมีปริมาณสูงกว่ามาตรฐานของไบโอดีเซลที่จะต้องมีความเป็นกรดไม่เกิน 0.50 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม [15] ซึ่งหากมีปริมาณกรดไขมันอิสระมากกว่ามาตรฐานกำหนดส่งผลต่อการกัดกร่อนในเครื่องยนต์ ทำให้อายุการใช้งานของปั๊ม และไส้กรองน้ำมันลดลง ซึ่งในอนาคตต้องมีการศึกษาเพื่อปรับปรุงคุณภาพต่อไป

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อจุลินทรีย์ *A. eutrophus* เริ่มจากการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, ฟรุคโตส และกากน้ำตาล ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลจะให้การเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อจุลินทรีย์ *A. eutrophus* ได้ดีที่สุด โดยมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 4.16 กรัมต่อลิตร ปริมาณความเข้มข้นของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 2.35 กรัมต่อลิตรโดยคิดเป็นปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสะสมเท่ากับ 56.49 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง การเปรียบเทียบระบบการหมักในถังปฏิกรณ์ระหว่างหมักในระบบกะ และการหมักในระบบกึ่งกะ พบว่าในการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ในระบบกะ จะให้การเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อจุลินทรีย์ *A. eutrophus* ได้ดีกว่าการเลี้ยงในระบบกึ่งกะ และสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ชนิดไฮดรอกซีเมทิลเอสเทอร์ได้โดยไฮดรอกซีเมทิลเอสเทอร์ที่ได้มีโครงสร้างทางเคมีเหมือนไบโอดีเซล และมีค่าความเป็นกรดอยู่ที่ 1.173 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ และสาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

เอกสารอ้างอิง

- [1] อศิรา เพื่อฟ้าชาติ. (2544). “บรรจุภัณฑ์โพลิเมอร์ชีวภาพย่อยสลายพร้อมเศษอาหาร”, **วารสารพลาสติก**. 17 (5), 68-73.
- [2] Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., & Woo, S. I. (1994). “Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control”, **Biotechnol Bioeng**. 43(9), 892-898.
- [3] Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. (2003). “Bioplastics from microorganisms”, **Current Opinion in Microbiology**. 6 (3), 251-260.
- [4] Evan. J. D., & Sikdar, S. K. (1990). “Biodegradable plastics : an idea whose time has come”, **Chemical Technology**. 20(1), 38-42.
- [5] Sangkharak, K. (2011). “The production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from renewable feedstocks derived from various wastes”, **Thaksin University Journal**. 14(1), 97-110.
- [6] Zhang, X., Luo, R., Wang, Z., Deng, Y., & Chen, G. Q. (2009). “Application of (R)-3-Hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels”, **Biomacromolecule**. 10(4), 707-711.
- [7] Dobois, M., K.A., Gilles, J.K., Hamilton, P.A., & Rebers, Smith, F. (1956). “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”, **Anal. Chem**. 28(3), 350-356.
- [8] ปิยาภรณ์ วงศิริกุล นิษา ไพจิตร เทวัญ หุ่ยหนู และกนกพร สังข์รักษ์. (2557). “การสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้ออัลคาลิเจเนส ยูโทรฟัสด้วยสารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบจากน้ำสับปะรด”, **วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์**. 6(2), 105-116.
- [9] Wang, S. Y., Wang, Z., Liu, M. M., Xu, Y., Zhang, X. J., Chen, G. Q. (2010). “Properties of a new gasoline oxygenate blend component: 3-Hydroxybutyrate methyl ester produced from bacterial poly-3-hydroxybutyrate”, **Biomass and Bioenergy**. 34(8), 1216-1222.
- [10] Holding, A. J. & Shewan, J. M. (1974). “Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919”, In Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., **Bergey’s manual of determinative bacteriology**. (pp.273 - 275). Baltimore :Williams & Wilkins.
- [11] Anderson, A. J. & Dawes, E. A. (1990). “Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates”, **Microbiological reviews**. 54(4), 450-472.
- [12] Beulieu, M., Beulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., & Goulet, J. (1994). “Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate”, **Applied and Environmental Microbiology**. 61(1), 165-169.
- [13] สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. (2547). **เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม**. กรุงเทพฯ : คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- [14] Amor, S. R., Rayment, T., & Sanders, J.K.M. (1991). “Poly(3-hydroxybutyrate) in vivo: NMR and X-ray characterization of the elastomeric state”, **Macromolecules**. 24(16), 4583-4588.
- [15] กรมธุรกิจพลังงาน. (2556, 14 พฤศจิกายน). ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน : กำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันพ.ศ. ๒๕๕๖. **ราชกิจจานุเบกษา**. (130), 15-17. สืบค้นเมื่อ 28 มกราคม 2558, จาก <http://www.ratchakitcha.soc.go.th>.
- [16] Donnell, S., Demshemino, I., Yahaya, M., Nwadika, I., & Okora, L. (2013). “A review on the Spectroscopic Analyses of Biodiesel”, **European International Journal of Science and Technology**. 2(7), 137-146.