รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกรดไขมันระเหยง่าย ที่ผลิตจากการหมักเส้นใยปาล์ม

Production of polyhydroxyalkanoate from volatile fatty acids produced from palm oil fiber fermentation

จัดทำโดย

ปิยะรัตน์ บุญแสวง

เบญจมาส เชียรศิลป์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2549-2550

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต หรือ PHA ได้รับความสนใจเนื่องจากมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์และสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้พลาสติกชีวภาพจาก PHA ลดผลกระทบต่อปัญหามลภาวะเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามการผลิต PHA มีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าพอลิเมอร์สังเคราะห์ เนื่องจากแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตมีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงสนใจการผลิต PHA จากเส้นใยปาล์มซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังเป็นการสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าและเป็นมิตรต่อสิ่ง แวดล้อม

แหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHA ที่สำคัญคือกรดไขมันระเหยง่าย แต่ไม่สามารถใช้เส้นใยปาล์มเป็นวัตถุดิบในการผลิต PHA ได้โดยตรง การหมักเส้นใยปาล์มแบบไร้อากาศสามารถผลิตกรดไขมันระเหยง่ายเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิต PHA ได้ ในการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA จากกรดไขมันระเหยง่ายที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มในระบบแบทเกะและแบบกึ่งกะ และศึกษาการย่อยสลาย PHA ที่ผลิตได้ หลังจากที่เส้นใยปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพเมื่อนำมาหมักแบบไร้อากาศ เป็นระยะเวลา 10 วัน ผลการทดลองพบว่า องค์ประกอบของน้ำหมักประกอบด้วย กรดทั้งหมด 851 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลรีดิวซ์ 18 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสเฟต 287 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนโตรเจน 35 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 3,395 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มาเพาะเลี้ยง *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 แบบกะในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยการวางแผนการทดลองทีละปัจจัย พบว่า การเติมกรดบิวทีริก 5 กรัมต่อลิตรในน้ำหมักกรดไขมันระเหยง่ายที่ผลิตจากการหมักเส้นใยปาล์ม จะส่งเสริมการเจริญและการผลิต PHA มากกว่าการเติมกรดโพรพิโอนิกและการไม่เติมกรด โดยให้ปริมาณเซลล์และ PHA เท่ากับ 3.12 และ 2.81 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 48 ตามลำดับ ขณะที่การเปลี่ยนแปลงค่า C:N ratio และการเติมฟอสเฟตไม่มีผลต่อการผลิต PHA นอกจากนี้ ยังพบว่า การปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 มีการเจริญและการผลิต PHA น้อยมาก ขณะที่การปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 และ 8.0 มีการเจริญและการผลิต PHA ที่ใกล้เคียงกันแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และเมื่อวางแผนการทดลองแบบการศึกษาปัจจัยร่วม พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือการเติมโพรพิโอเนต บิวทิเรต แอมโมเนียมซัลเฟต และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เท่ากับ 2.5, 6.53, 1.5 และ 0.3 กรัมต่อลิตร จากสมการโพลิโนเมียลกำลังสองของสภาวะดังกล่าวมีผลให้ได้เซลล์และ PHA สูงสุด เท่ากับ 1.52 และ 0.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีการสะสม PHA เท่ากับ 46.5% ซึ่งต่ำกว่าผลจากการวางแผนการทดลองทีละปัจจัย เนื่องจากใช้น้ำหมักเส้นใยปาล์มที่ผ่านการหมักคนละครั้ง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิต PHA แบบกะในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร พบว่า การให้อากาศ 1.0 vvm ร่วมกับการกวนด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที มีการเจริญและ

การผลิต PHA ได้ดีที่สุด และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบกะ (การเติมอาหารครั้งเดียว) และแบบกึ่งกะ(การเติมอาหาร 2 ครั้ง) พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ที่ชั่วโมง 96) สามารถผลิตเซลล์ได้ประมาณ 4 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะให้ผลผลิต PHA สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ ประมาณ 1.30 เท่า

เมื่อนำ PHA ที่ผลิตได้จาก *R. eutropha* TISTR 1095 มาศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ พบว่าพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ประกอบด้วย หน่วยย่อยของ HB และ HV คิดเป็น 81.7 และ 18.3% ตามลำดับ มีอุณหภูมิหลอมเหลวและอุณหภูมิแข็งตัวของผลึกเท่ากับ 135.3 และ 49.2 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเชิงความหนืด (Mv) เท่ากับ 448,900 ดาลตัน และเมื่อนำ PHAที่ผลิตได้มาขึ้นรูปเป็นพลาสติกชีวภาพแล้วนำไปศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายในดิน น้ำเสีย น้ำคลอง น้ำทะเล และใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นชุดควบคุม พบว่า พลาสติกชีวภาพสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม พบว่า ภานในระยะเวลา 2 เดือน พลาสติกชีวภาพในน้ำเสียเกิดการยุ่ยจนไม่สามารถนำมาชั่งหาน้ำหนักได้ ขณะที่พลาสติกชีวภาพในน้ำคลองมีน้ำหนักหายไป 9.08%

Abstract

Currently biopolymer, Polyhydroxyalkanoate or PHA, is interesting because its properties similar to synthetic polymer and can biodegrade. From above properties, bioplastic from PHA can reduce pollutant to environment. However, PHA production has higher cost than synthetic polymer due to the expensive substrate. This research interested PHA production from palm oil fiber, which is the residue from palm oil industry. This substrate has potential to reduce the production cost and produce value-add product with environmental friendly.

Major carbon source for PHA production is volatile fatty acid. Palm oil fiber cannot directly use to produce PHA. Therefore, the fermentation of palm oil fiber can produce volatile fatty acid as substrate for PHA production. This research aimed to study the optimum condition for PHA production from volatile fatty acid produced from palm oil fiber fermentation in batch and fed-batch system. Also, the biodegradation of PHA was investigated. After the pretreated palm oil fiber was anaerobically fermented for 10 days, it was found that fermented broth contained total cid of 851 mg/l, reducing sugar concentration of 18 mg/l, phosphate concentration of 287 mg/l, nitrogen concentration of 35 mg/l and total organic carbon of 3,395 mg/l. Afterward, the fermented broth was used to cultivate *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 in 500 ml-Erlenmayer flask. By using experimental design with one variable at a time method, it was found that the supplement of butyric acid at concentration of 5 g/l in volatile fatty acid broth produced from palm oil fiber fermentation enhanced the growth and PHA production higher than the supplement of propionic acid and without acid supplement. The cell and PHA concentration were found at 3.12 and 2.81 g/l at 48 h. Whereas C:N ration adjustment and phosphate addition had no effect on PHA production. Moreover, it was found that the initial pH adjustment to 6.5 gave low growth and PHA production. The initial pH adjustment to 7.0 and 8.0 gave similar growth and PHA production with no significantly difference ($p>0.05$). Moreover, the experimental design with the combined effects of all test variables method was investigated. It was found that the optimum condition was palm oil fiber fermented broth supplemented with propionate, butyrate, ammonium sulfate and potassium dihydrogen phosphate of 2.5, 6.53, 1.5 and 0.3 g/l, respectively. From the polynomial equation with power of two by using the optimum condition, the cell and PHA concentration of 1.52 and 0.64 g/l were obtained with PHA content of 46.5%, which were lower than the results from experimental design with one variable at a time method due to the difference of palm oil fiber fermented broth.

Furthermore, the optimum condition for growth and PHA production in 3-l bioreactor in batch system was studied. It was found that aeration of 1.0 vvm and agitation of 100 rpm gave the highest growth and PHA production. Also, batch cultivation (one time substrate addition) and fed-batch cultivation (two times substrate addition) were investigated. The result showed that both cultivations gave cell concentration about 4.0 g/l at the end of experiment (96 h) with no significantly difference ($p>0.05$). However, fed-batch cultivation gave higher PHA production than batch cultivation about 1.3 times.

The properties of PHA produced from *R. eutropha* TISTR 1095 were examined. It was found that polymer consisted of 81.7%HB and 18.3%HV. Melting and crystalline temperatures were 135.3 and 46.6^{O}C. The average viscosity molecular weight (Mv) was 448,900 dalton. Furthermore, PHA produced from this research was formed as bioplastic and then was studied the efficiency of degradation in soil, wastewater, community water resource, seawater and sterile distilled water (control). The result showed that bioplastic can degrade in environment depending on environmental condition. During 2 months, it was found that bioplastic in wastewater was very fragile and cannot be weighted. Whereas, the weight loss of bioplastic in community water resource was 9.08%.