กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยโครงการวิจัยเรื่อง “การใช้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการเป็นตัวเร่งปฏิกริยาชีวภาพเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก” ใคร่ขอขอบคุณ จากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สภาวิจัยแห่งชาติ ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยหมวดอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2552 และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์พื้นฐานต่างๆ ทำให้การดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้อย่างดี ทำให้เกิดผลงานและประสิทธิภาพในการวิจัยในครั้งนี้

รศ.ดร.สิรินดา ยุ่นฉลาด

หัวหน้าโครงการวิจัย

31 มีนาคม 2553

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไลเปส (Lipases) เป็นเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสของเอสเทอร์ของไขมัน ให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ถูกใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนพืชน้ำมันให้กลายเป็นน้ำมันไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (transesterification) เพื่อให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) สามารถพบเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งจากพืช รวมถึงจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ ในการวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างที่ได้จากดินและน้ำที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ที่มีการทิ้งของเสีย โดยในขั้นแรกได้คัดแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยการนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Rhodamine B olive oil ที่ได้รับการปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้มี pH เท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หากโคโลนีใดให้ผลบวกซึ่งคาดว่าน่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยผลบวกคือลักษระของที่โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารจะมีสีชมพูพร้อมกับมีโซนใส (clear zone) เกิดขึ้นรอบๆโคโลนี ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวช่วงคลื่น 340 นาโนเมตร จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกมาทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งหากมีการแสดงกิจกรรมไลเปสก็จะมีการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระออกมา ซึ่งสังเกตุเห็นได้จากสีที่เกิดขึ้นของอินดิเคเตอร์ งานวิจัยนี้ได้คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจำนวน 55 ไอโซเลท และจากตัวอย่างน้ำจำนวน 40 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 12 ไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (จากดิน 4 ไอโซเลท, จากน้ำ 8ไอโซเลท) ซึ่งจากจำนวนทั้ง 12 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท LA 5 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ 1.21 ยูนิต/มิลลิลิตร จากนั้นนำไอโซเลท LA5 มาทำการตรึงเซลล์ ด้วยสารละลายโซเดียมแอลจีเนต พบว่าที่ความเข้มข้น 2%โซเดียมแอลจีเนต ให้ผลการตรึงเซลล์ดีที่สุดคือ เซลล์ไม่เกิดการรั่วและแตก มีความคงตัวของการตรึงเซลล์ และเมื่อทำการตรึงเซลล์เสร็จเรียบร้อยจึงนำไปทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชั่นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้น้ำมันสกัดจากสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal oil) และเซลล์ที่ตรึงเสร็จเรียบร้อยแล้ว หลังจากทำปฏิกริยาเสร็จสมบูรณ์ทำการตรวจหาเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography, GC) พบว่า เมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นไม่มีความต่างจากเมธิลเอสเทอร์ของน้ำมันดีเซลทั่วไป และเมื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพน้ำมันของไบโอดีเซลที่เกิดขึ้น มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 7.2 และมีค่าความหนาแน่นเท่ากับ 0.884 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานไบโอดีเซลของประเทศสหรัฐอเมริกา

Abstract

Lipase (**EC 3.1.1.3**) is a water-soluble enzyme that catalyzes the hydrolysis reaction of ester bonds in water–insoluble, lipid substrates. It has been exploited in several industries including the conversion of vegetable oil into biodiesel via transesterification reaction to produce methyl esters. We have isolated lipase producing bacteria from soil and waste water samples using strain isolation on rhodamine B-olive oil agar plate, pH to 7.0. It was incubated at 37 ^{O}C for 48 h. Preliminary indicator to be used to screen for lipase activity of each isolated colony was carried out by visualization of a surrounding clear zone around the colony and illuminated as pinkish colour when it was exposed under UV light. Lipase activity of each of the positive colony was determined by titration of the amount of released free fatty acids with 25 mM sodium hydroxide with phenolphthalein as an indicator to indicate end point. The amount of enzyme that catalyzed the release of 1 mmol of fatty acids per hour at 35 ^{O}C. Among the 55 isolates form soil sample and the 40 isolates from water samples, twelve isolates (4 isolates from soil samples and 8 isolates from water samples) were primarily exhibited lipolytic activities. Among those twelve isolates, isolate number LA5 was able to produce the relatively highest in its lipase activity at 1.21 units/mL in a liquid medium containing 2% olive oil as sole carbon source at 37 ^{O}C, pH 7.0 for 48 h. Isolate number LA5 was subjected for cell immobilization by entrapment with sodium alginate to improve stability and reuse of its lipase activity. The methyl esters resulted from transesterification for biodiesel production was carried out in a bioreactor. The results is indicated that the 2.0% (w/v) sodium alginate concentration is the optimal concentration to be used for cell immobilization via the entrapment method and microalgal oil was used as the substrate. The immobilized cell of isolate LA5 provides the methyl esters C16 and C18 determined by gas chromatography and were found to be the same as the ones in diesel oil. In addition, biodiesel properties showed in the density and pH value of 0.884 g mL^{-1} and 7.2 respectively. These were corresponded to standard limitation established by American Society for Test Material (ASTM).

สารบัญเรื่อง

หัวข้อ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ	II
Abstract	III
สารบัญเรื่อง	IV
สารบัญรูปภาพ	VI
สารบัญตาราง	VII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 คณะผู้วิจัยและสัดส่วนการทำงานวิจัย	1
1.2 ประเภทการวิจัย	1
1.3 สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาการที่ทำวิจัย	1
1.4 คำสำคัญ (Keywords) ของการวิจัย	1
1.5 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.6 วัตถุประสงค์หลัก	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เอนไซม์ไลเปส (Lipase)	5
2.2 ตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst)	5
2.3 แหล่งของจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปส	7
2.4 น้ำมันจากสาหร่าย (Algal oil)	10
2.5 ไบโอดีเซล (Bidiesel)	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง	13
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	13
3.3 สารเคมี	14
3.4 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส	14
3.5 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	16
3.6 การวิเคราะห์ Lipolytic activity	16
3.7 การตรึงเซลล์	17
3.8 การทำปฏิกริยาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor	18

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส 19

4.2 การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยการย้อมสีแบคทีเรีย 20

4.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 20

4.4 ผลการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต 21

4.5 การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่าย 22

4.6 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ คือ 23

4.7 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตไบโอดีเซล 24

บทที่ 5 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส 25

5.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 25

5.3 การตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมแอลจิเนต 25

5.4 การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสกัดจากสาหร่าย 25

5.5 ข้อจำกัดของงานวิจัย 26

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ข. ข้อมูลดิบและวิธีการทดลอง

ภาคผนวก ค. การเผยแพร่งานวิจัยในต่างประเทศ

สารบัญรูปภาพ

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะทางจุลชีววิทยา ของแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ไลเปส	8
รูปที่ 2 ปฏิกริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) ของกรดไขมันร่วมกับเมทานอล	11
รูปที่ 3 ชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor	18
รูปที่ 4 การเรืองของโคโลนีที่ให้ผล positive ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Rhodamine B olive oil agar	19
รูปที่ 5 รูปภายของเซลล์จุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า	20
รูปที่ 6 แสดงผลการไตเตรทเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์กับ 0.02 M NaOH โดยใช้ 0.1 %phenolphalein เป็นอินดิเคเตอร์	21
รูปที่ 7 แสดงเม็ดเจลที่เกิดขึ้น ของเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่ 2% โซเดียมแอลจิเนต ที่หยดลงบนสารละลาย 0.2 M $CaCl_2$	22
รูปที่ 8 แสดงชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor	22
รูปที่ 9 โครมาโตแกรมของน้ำมันดีเซลล์หลังจากผ่านปฏิกริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น ในชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor	23

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการผลิตไบโอดีเซลด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่าง ๆ	7
ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้า	9
ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำมันที่มีอยู่ในสาหร่ายบางสายพันธุ์	10
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนของเชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ รวมถึงค่าการวัดกิจกรรมของเอนไซม์	19
ตารางที่ 5 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการไตเตรท	21