ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
242386

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

โดย ดร. วรสิทธิ์ โทจำปา และคณะ

มิถุนายน 2554

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
242386
สัญญาเลขที่ AG-AR-073/2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา คณะเกษตรศาสตร์ ฯ
2. ดร. อรวรรณ กฤตสุนันท์กุล คณะวิทยาศาสตร์

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

242386

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากกลีเซอรอลโดยใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 ในการทดลองระดับขวดเขย่าได้ศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลีเซอรอลทางการค้าและกลีเซอรอลดิบจากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุด 1.454 กรัมต่อลิตรและ 0.984 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อการเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* TISTR 781 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กลีเซอรอลดิบเริ่มต้น 12.99 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและใช้โซเดียมไนเตรตเริ่มต้น 4.69 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดเท่ากับ 1.38 กรัมต่อลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวโดยการเติมกลีเซอรอลดิบในอัตรา 0.045 ลิตรต่อชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวได้เป็น 1.80 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถลดแรงตึงผิวของ PBS จาก 72.03 mN/m เป็น 32 mN/m โดยมีค่า critical micelle concentration มากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สารแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถเกิดอิมัลชั่นได้ดีกับน้ำมันปาล์ม น้ำมันดีเซล และน้ำมันก๊าด แต่เกิดอิมัลชั่นได้ไม่ดีกับเฮกเซน ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชั่นลดลงทุกกรณี ยกเว้นกับน้ำมันปาล์ม นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดอิมัลชั่นได้ดีที่พีเอชมากกว่า 10 และโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้การเกิดอิมัลชั่นลดลง

คำสำคัญ: แรมโนไลปิด สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ผลพลอยได้จากไบโอดีเซล การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว *Pseudomonas aeruginosa*

242386

Abstract

This research studied the production of biosurfactant from glycerol by *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781. Commercial glycerol and crude glycerol from biodiesel production process were used as carbon substrate in the shaking flask experiments. The final concentration of biosurfactant of 1.454 g/l and 0.984 g/l were obtained using commercial and crude glycerol as a carbon substrate, respectively. *P. aeruginosa* was cultivated in a bioreactor using initial crude glycerol concentration of 12.99 g/l and initial sodium nitrate concentration of 4.69 g/l as a carbon source and a nitrogen source, respectively. The final concentration of biosurfactant of 1.38 g/l was obtained. Fed-batch cultivation with crude glycerol feed rate of 0.045 L/h produced final biosurfactant concentration of 1.80 g/l. Biosurfactant could reduce surface tension of PBS from 72.03 mN/m to 32 mN/m. The critical micelle concentration was above 1,000 mg/l. Biosurfactant could form an emulsion with palm oil, diesel and kerosene. Emulsions were stable at alkaline condition (above pH 10). An emulsification property of the biosurfactant with diesel oil, kerosene was affected by temperature, where palm oil was not. Emulsification index of the biosurfactant was decreased with higher sodium chloride concentration.

Keyword: Rhamnolipid, biosurfactant, biodiesel by-product, fed-batch culture, *Pseudomonas aeruginosa*

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ธันวาคม 2551 – 30 มิถุนายน 2554

ที่มาและความสำคัญ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต เช่น Rhamnolipids จาก *Psuedomonas aeruginosa* Surfactin จาก *Bacillus subtilis* และ Sophorolipids จาก *Candida bombicola* สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อดีเหนือกว่าสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยาเคมี คือ มีความเสถียรแม้อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นเกลือสูงหรือต่ำมากๆ ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ และไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากศักยภาพในการใช้งานได้หลากหลายทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร การแพทย์ และอุตสาหกรรมน้ำมัน ทำให้การผลิตเชิงอุตสาหกรรมได้รับความสนใจมากขึ้น แต่ข้อจำกัดอย่างหนึ่งที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังไม่สามารถผลิตขึ้นมาแข่งขันกับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีได้ เนื่องจากผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำและต้นทุนการผลิตยังสูงอยู่ ซึ่งเกิดจากราคาวัตถุดิบที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาแพง ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้คือ การเลือกใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้มีผลได้ (yield) และอัตราการผลิต (productivity) สูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการใช้ผลพลอยได้ราคาถูกจากการผลิตไบโอดีเซลมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการที่เหมาะสมเพื่อให้มีผลได้และผลผลิตสูงขึ้น รวมทั้งเป็นการจัดการกลีเซอรอลอย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วยกลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการนำมาใช้สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ ผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลนอกจากมีกลีเซอรอลแล้ว ยังมีกรดไขมันอิสระและเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันปนอยู่ด้วย ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้เพื่อการเติบโตและการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากกลีเซอรอลดิบโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) และแบบครั้งคราว (fed-batch culture) ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*
2. ตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

ผลการทดลอง

ในการทดลองระดับขวดเขย่าได้ศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลีเซอรอลทางการค้าและกลีเซอรอลดิบจากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุด 1.454 กรัมต่อลิตรและ 0.984 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อการเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* TISTR 781 ใน

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กลีเซอรอลดิบเริ่มต้น 12.99 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและใช้โซเดียมไนเตรตเริ่มต้น 4.69 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดเท่ากับ 1.38 กรัมต่อลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวโดยการเติมกลีเซอรอลดิบในอัตรา 0.045 ลิตรต่อชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวได้เป็น 1.80 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถลดแรงตึงผิวของ PBS จาก 72.03 mN/m เป็น 32 mN/m โดยมีค่า critical micelle concentration มากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สารแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สามารถเกิดอิมัลชั่นได้ดีกับน้ำมันปาล์ม น้ำมันดีเซล และน้ำมันก๊าด แต่เกิดอิมัลชั่นได้ไม่ดีกับเฮกเซน ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชั่นลดลงทุกกรณี ยกเว้นกับน้ำมันปาล์ม นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดอิมัลชั่นได้ดีที่พีเอชมากกว่า 10 และโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้การเกิดอิมัลชั่นลดลง

จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลดิบสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch culture) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยที่สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้นี้สามารถเกิดอิมัลชั่นได้ดีกับน้ำมันปาล์ม ความคงตัวของอิมัลชั่นจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของเกลือ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
	ขอบเขตของงานวิจัย	3
	สมมติฐานของการวิจัย	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	5
	แรมโนลิปิด (Rhamnolipid)	7
	ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิด	7
	จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิต rhamnolipids	7
	การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)	9
	การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (Fed-batch culture)	10
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	12
	วัตถุดิบ	12
	สายพันธุ์ของแบคทีเรียและสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ	12
	สารเคมี	12
	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	13
	ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย	14
	คุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	14
	ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบระหว่าง	14

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การผลิต rhamnolipid โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร	15
	การผลิต rhamnolipid โดยการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch culture)	17
	การทดสอบคุณสมบัติของ rhamnolipid	17
	ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของ rhamnolipid	18
4	**ผลการวิจัย**	20
	คุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	20
	ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบระหว่าง Commercial glycerol และ Crude glycerol	20
	การผลิต rhamnolipid โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร	31
	การผลิต rhamnolipid โดยการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch culture)	36
	ผลการทดสอบคุณสมบัติของ rhamnolipid	39
	ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของ rhamnolipid	40
5	**บทสรุป**	47
	สรุปผลการวิจัย	47
บรรณานุกรม		50

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปริมาณกลีเซอรอลที่ละลายได้ในเฮกเซนจากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	20
2	ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยใช้ Commercial Glycerol และ Crude Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน.....	24
3	ค่าผลได้ (Yield) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Rhamnolipids ที่ใช้ Commercial Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน.....	25
4	ค่าความเข้มข้นของ Rhamnolipids ที่วัดได้ในวันสุดท้ายในกรณีที่ใช้ Crude Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน.....	25
5	ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยใช้ Commercial Glycerol และ Crude Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน.....	29
6	ค่าความเข้มข้นของ Rhamnolipids ที่วัดได้ในวันสุดท้ายใน Commercial glycerol และ Crude Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นของไนเตรตแตกต่างกัน.....	30
7	ค่า Emulsification activity (E_{24}) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคือ Commercial glycerol และ Crude glycerol.....	30
8	ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่ออัตราการเติบโตและผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)	33
9	ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่ออัตราการเติบโตและผลได้ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture).....	34
10	ผลของอัตราการไหลของอาหารต่ออัตราการเติบโตและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	36
11	การเปรียบการเพาะเลี้ยงแบบ Batch และ แบบ Fed-batch ต่ออัตราการเติบโตและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	37

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ rhamnolipid biosurfactants.....	8
2	การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture)...	10
3	การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (Fed-batch culture).....	10
4	การเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยมี Commercial glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน.....	22
5	การเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยมี Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน.....	23
6	การเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยมี Commercial glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นไนเตรตแตกต่างกัน.....	27
7	การเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* TISTR 781 โดยมี Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นไนเตรตแตกต่างกัน.....	28
8	จลนพลศาสตร์การเติบโตของเชื้อเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 781 โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร.....	32
9	จลนพลศาสตร์การเติบโตของเชื้อ *P. aeruginosa* TISTR 781 โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 12.99 g/L และความเข้มข้นของไนเตรทระดับต่างๆ.....	35
10	จลนพลศาสตร์การเติบโตของเชื้อ ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 12.99 g/L และความเข้มข้นของไนเตรท 4.69 g/L ในการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch.....	38
11	ค่าแรงตึงผิวกับความเข้มข้นของแรมโนลิปิด ในสารละลาย Phosphate buffer saline.....	39
12	ความสามารถการเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดในน้ำมันชนิดต่างๆ.....	40
13	การเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (80-121 °C).....	41
14	ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความคงตัวของแรมโนลิปิด.....	42
15	การเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดที่พีเอชแตกต่างกัน (pH 2-12).....	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
16	ผลของพีเอชต่อประสิทธิภาพของแรมโนลิปิด…….….....	16
17	การเกิดอิมัลชันของแรมโนลิปิดที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน (0-10%).....	45
18	ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อประสิทธิภาพของแรมโนลิปิด……..	46