

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย	การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส และการประยุกต์ใช้ยีสต์ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม
ผู้วิจัย	ผศ.ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทระศิริ และ ผศ.ดร. เบญจมาศ เชียรศิลป์
ที่อยู่ E-mail	tipparat.h@psu.ac.th
ระยะเวลาการวิจัย	1 ตุลาคม 2549 ถึง 30 กันยายน 2551

243355

เมื่อนำยีสต์ที่แยกได้จากทะเลจำนวน 77 สายพันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหาร yeast-malt agar (YM) ซึ่งมีการเติมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ และ Rhodomine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีสต์จำนวน 30 สายพันธุ์ โคโลนีของยีสต์มีสีชมพู-ส้ม และนำยีสต์ที่คัดเลือกได้มาวัดกิจกรรมไฮโดรไลซิส พบว่ายีสต์ที่มีกิจกรรมไฮโดรไลซิสสูง 10 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ KT2.5.1, KT1.8.1, PHK 2B, PHK 8B, KT.1.7.1, KT 2.11.1, PHK1A-1, KT 2.13.1, PHK 2.2 และ TR16 ซึ่งสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมสูงสุดได้แก่สายพันธุ์ PHK1A-1 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 1.372 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สายพันธุ์ TR16, KT2.13.1, PHK 2.2, PHK8B, PHK2B, KT 1.8.1, KT 2.5.1, KT2.11.1 และ KT 1.7.1 มีค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสเท่ากับ 1.24, 1.03, 1.02, 1.00, 1.00, 0.97, 0.94 และ 0.92 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อนำยีสต์จำนวน 10 สายพันธุ์ มาศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเอสเทอร์ริฟิเคชัน และปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม/กรดปาล์มิติกต่อเมทานอล 1:3 (โมล/โมล) โดยใช้เซลล์จำนวน 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มียีสต์สายพันธุ์ใดที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มได้เลย อย่างไรก็ตามส่วนใสของยีสต์สายพันธุ์ PHK 2.2 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพียง 0.31 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ PHK 8B สามารถผลิตเมทิลปาล์มิตेटได้สูงสุดคือ 0.67 เปอร์เซ็นต์ จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของกรดปาล์มิติก และส่วนใสของสายพันธุ์ KT 1.8.1 สามารถผลิตเมทิลปาล์มิตेटได้สูงสุด คือ 1.86 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ KT.1.7.1, PHK 2.1, KT 2.11.1, PHK 2B และ PHK 8B สามารถผลิตเมทิลปาล์มิตेटเท่ากับ 1.75, 1.67, 1.47, 1.43 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ส่วนการแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน, น้ำ และกากปาล์ม จากโรงงานน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทย โดยใช้อาหาร YM และ อาหาร Isolation medium for yeast (IMY) ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ rhodamine B เพื่อแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในขั้นตอนเดียว โดยเลือกโคโลนีที่เรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร สามารถแยกยีสต์ที่ผลิตไลเปสได้ 206 สายพันธุ์ โดยแยกได้จากอาหาร YM 117 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 89 สายพันธุ์ เมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท พบยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์จำนวน 22 และ 27

สายพันธุ์ ที่แยกจากอาหาร YM และ IMY ตามลำดับ แต่เมื่อทำการวัดกิจกรรมการย่อยสลายไขมันของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี two-phase emulsion ที่ใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท พบว่า มีเพียงยีสต์สายพันธุ์ P11189 เท่านั้นที่สามารถวัดค่ากิจกรรมด้วยวิธีนี้ได้ โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 1.54 ± 0.031 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*pPNC*₁₆) เป็นสับสเตรทเท่ากับ 0.03 ± 0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยีสต์ทั้ง 49 สายพันธุ์ สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกและเมทานอลได้ แต่มีเพียง 16 สายพันธุ์ เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มได้ โดยที่ยีสต์สายพันธุ์ P11189 สามารถผลิตโอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ และเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 64.12 และ 51.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส 28S rDNA ยีสต์สายพันธุ์ P11189 คือสายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* (GenBank accession number EU637076.1) มีความเหมือน (homology) เท่ากับ 99 (523/525 bp) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 ของการเจริญในระยะ Stationary phase โดยมีค่ากิจกรรม *p*-nitrophenyl palmitate (*pPNC*₁₆) และน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท เท่ากับ 0.09 ± 0.005 และ 2.53 ± 0.044 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือสภาวะที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล อัตราส่วนโดยโมล 1:6 เป็นสับสเตรท สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.0 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท, เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัม สับสเตรทเป็นตัวเร่ง คิดเป็นกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 1.096 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ 83.63 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ลดลงเป็น 59.09 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเซลล์ยีสต์มาใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันซ้ำอีกครั้ง โดยเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน คือ ปาล์มเมทิลเมทิลเอสเทอร์, โอเลอิกเมทิลเอสเทอร์, ลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์ และ สเตียริกเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 38.18, 34.22, 10.16 และ 4.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังคงเหลือกรดไขมันชนิดกรดปาล์มเมทิลและกรดโอเลอิก 5.41 และ 1.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Keywords: palm biodiesel, methyl ester, yeast lipases, transesterification