ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47314

การชี้พร่องร่วมในการหรี่ไฉเทสจาก *Candida rugosa* เพื่อการผลิตไบโอดีเซล

นางสาวกิ่งแก้ว พิริยะคณานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00254794

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47314

ภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไลเพสจาก *Candida rugosa* เพื่อการผลิตไบโอดีเซล

นางสาว กิ่งแก้ว พิริยะคณานนท์

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 9 7 2 2 2 3 4 2 3

OPTIMAL IMMOBILIZATION CONDITIONS OF LIPASE FROM *Candida rugosa* FOR BIODIESEL PRODUCTION

Miss Kingkaew Piriyakananon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	Optimal immobilization conditions of lipase from *Candida rugosa* for biodiesel production
By	Miss Kingkaew Piriyakananon
Field of Study	Biotechnology
Advisor	Associate Professor Tikamporn Yongvanich
Co-Advisor	Pakorn Winayanuwattikun, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... Advisor
(Associate Professor Tikamporn Yongvanich)

..... Co-Advisor
(Pakorn Winayanuwattikun, Ph.D.)

..... Examiner
(Kittinan Komolpis, Ph.D.)

..... External Examiner
(Jittima Charoenpanich, Ph.D.)

กิ่งแก้ว พิริยะคณานนท์ : ภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไลเพสจาก *Candida rugosa* เพื่อการผลิตไบโอดีเซล (OPTIMAL IMMOBILIZATION CONDITIONS OF LIPASE FROM *Candida rugosa* FOR BIODIESEL PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ทิฆัมพร ยงวณิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ. ดร. ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ, 137 หน้า.

E47314

ไบโอดีเซลหรือ เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน เป็นแหล่งพลังงานที่ไม่เป็นพิษ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพ และสร้างขึ้นใหม่ได้ ในปัจจุบัน การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันมีความน่าสนใจมากขึ้น เนื่องจาก การแยกผลิตภัณฑ์ร่วมกลีเซอรอล และกระบวนการทำให้ไบโอดีเซลบริสุทธิ์ทำได้ง่าย ไลเพสจากเชื้อ *Candida rugosa* (CRL) มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง แต่เอนไซม์มีราคาแพงจึงเป็นอุปสรรคในการนำมาใช้ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุน ในงานวิจัยนี้จึงทำการตรึงรูปเอนไซม์ไลเพสจากเชื้อ *Candida rugosa* บนตัวค้ำจุนที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกทั้งหมด 7 ชนิด โดยตัวค้ำจุนที่เลือกได้คือ Sepabeads EC-OD และภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึง CRL บน Sepabeads EC-OD คือค่าความเป็นกรดด่าง 6, ความแรงของไอออน 500 มิลลิโมลาร์, ปริมาณเอนไซม์ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, อุณหภูมิ 30 อาศาเซลเซียส, ระยะเวลาที่ใช้ในการตรึง 30 นาที และใช้เทอร์เชียรีบิวทานอล เป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึง หลังจากนั้นหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งด้วย CRL ตรึงรูปบน Sepabeads EC-OD ได้ดังนี้ การเติมเมทานอลแบบ 6 ขั้น , อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมัน 3 ต่อ 1, ปริมาณเอนไซม์ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักน้ำมัน, ปริมาณน้ำ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักน้ำมัน, ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อคัดเลือกน้ำมันจากเมล็ดพืชที่ไม่ใช้ในการบริโภค และของเหลือใช้ทางการเกษตร พบว่ามีน้ำมัน 6 ชนิดจากทั้งหมด 9 ชนิด ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพผ่านมาตรฐาน เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยเร่งด้วยไลเพสตรึงรูปทางการค้า 2 ชนิด เปรียบเทียบกับ CRL ที่ตรึงรูปบน Sepabeads EC-OD พบว่าน้ำมันจากเมล็ดพืช 3 ชนิด ได้แก่ มะละกอ เงาะ และ สบู่ดำ ให้ผลผลิตไบโอดีเซลที่สูงใกล้เคียงกันประมาณ 80 % เมื่อเร่งด้วยไลเพสตรึงรูปทั้ง 3 ชนิด ขั้นตอนสุดท้ายทดสอบการนำ CRL ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำทั้งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและไฮดรอลิซิส พบว่าผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้ลดลงอย่างมากในการใช้ครั้งที่ 2 และ 3 ในทางตรงกันข้ามพบว่าการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสคงที่หลังใช้แล้ว 10 ครั้ง

จากผลการทดลองทั้งหมด ชี้ให้เห็นว่า CRL ที่ตรึงรูปบน Sepabeads EC-OD ที่ได้ สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ในการผลิตไบโอดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเอนไซม์ตรึงรูปทางการค้า

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต กิ่งแก้ว พิริยะคณานนท์

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ

4972223423 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : LIPASES / IMMOBILIZATION / TRANSESTERIFICATION / BIODIESEL

KINGKAEW PIRIYAKANANON: OPTIMAL IMMOBILIZATION CONDITIONS OF LIPASE FROM *Candida rugosa* FOR BIODIESEL PRODUCTION. ADVISOR : ASSOC. PROF.TIKAMPORN YONGVANICH, CO-ADVISOR : PAKORN WINAYANUWUTTIKUN, Ph.D., 137 pp.

E 47314

Biodiesel or fatty acid methyl ester is a non-toxic, biodegradable and renewable energy source. Recently, biodiesel can be produced by lipase catalyzed transesterification and become more attractive since the by product, glycerol can be easily recovered and the purification process for biodiesel is simpler. *Candida rugosa* lipase (CRL) is one of the most frequently used enzymes. However, the cost of enzyme remains a barrier. To reduce the cost, CRL were immobilized on 7 types of hydrophobic supports and Sepabeads EC-OD was finally selected. Afterwards, various optimal conditions for the immobilization of CRL on Sepabeads EC-OD were investigated. The results were as follows; pH 6, 500 mM ionic strength, 8 mg/ml enzyme loading at 30 °C for 30 min and t-butanol as the adjuvant. The immobilized lipase was later applied for the catalysis of transesterification between palm oil and methanol. The optimal transesterification by the immobilized CRL on Sepabeads EC-OD were investigated. The results were as follows; 6-step addition mode of methanol, 3 to 1 molar ratio of methanol to palm oil, 30% enzyme loading by oil weight and 5% water content (v/w of oil) for12 hours at 40°C. Then, 6 from 9 types of non-edible and waste plant oils were selected from standard physical properties to be used as the substrates for the production of biodiesel by transesteriification catalyzed by 2 commercial immobilized lipase and CRL on SepabeadsEC-OD in comparison. The results showed that seed oils of 3 species; papaya, rambutan and physic nuts could be highly converted to biodiesel in comparable yield when the reactions were catalyzed by all 3 types of enzymes (approximately 80 %). Finally, the enzymes were tested for reusability in both transesterification and hydrolysis. For the biodiesel production, the activity considerably decreased after the 2^{nd}-3^{rd} cycle. In contrast, the relative hydrolytic activities of the immobilized lipase could be well maintained over ten repeated cycles. Overall results indicate that the obtained immobilized CRL on SepabeadsEC-OD can catalyze the transesterification for the production of biodiesel as efficiently as the commercial enzymes.

Field of Study : Biotechnology Student's Signature Kingkaew Piriyakananon

Academic Year : 2008 Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature Pakorn Winayanuwattikun

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and appreciation to my adviser, Assoc. Prof. Tikamporn Yongvanich, for her great advice, encouragement and her kind support, suggestion and help me in every thing and every time throughout this thesis.

I would like to express my deepest gratitude to my co-adviser, Dr. Pakorn Winayanuwattikun, for his invaluable guidance, advice, suggestion and comment throughout the process of this research, support and help me in every thing.

I would like to express greatest thanks to Associate Professor Dr. Warawut Chulaluksananukul for his laboratory facilities and support in this research.

I would like to extend my sincere thank to Miss Chutima Keawpiboon, Miss Supaluk Tantong, Mr. Weerasak Thakernkarnkit and Miss Kaewjai Sangkhaha for their friendship, kind assistance and suggestion.

I would like to acknowledge Agricultural Research Development Agency (Public Organization), Biofuel Production by Biocatalyst Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Shell Centennial Education Fund, Shell companies in Thailand and CU Graduate school thesis grant for their financial support on my work.

Finally, the greatest gratitude and indebtedness is expressed to my lovely family (my grandmother, my parents, my aunt and my uncle) for their unlimited love, willpower, encouragement, understanding and everything given to my life.

CONTENTS

Page

ABSTRACT THAI iv

ABSTRACT ENGLISH v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES x

LIST OF FIGURES xi

ABBREVIATIONS xiii

CHAPTER I INTRODUCTION 1

1.1 Statement of purpose 1

1.2 Objectives of this research 4

1.3 Scopes of the investigation 4

1.4 Expected results 5

1.5 Thesis organization 5

CHAPTER II THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEWS 6

2.1 Biodiesel 6

2.2 Lipase 11

2.3 Immobilization 15

2.4 Literature reviews 21

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS 26

3.1 Equipments 26

3.2 Chemicals 26

3.3 Data analysis 28

3.4 Research methodology 28

Page

3.4.1 Immobilization of *Candida rugosa* lipase..... 28

3.4.2 Support selection..... 29

3.4.3 Optimal condition for the immobilization..... 29

3.4.4 Transesterification and hydrolysis catalyzed by immobilized *Candida rugosa* lipase..... 32

3.4.5 Enzyme activity and enzyme assay..... 32

3.4.6 Screening of raw material for feedstock..... 34

3.4.7 Transesterification catalyzed by immobilized *Candida rugosa* lipase..... 35

3.4.8 Optimization of transesterification catalyzed by immobilized *Candida rugosa* lipase..... 35

3.4.9 Comparative studies of transesterification catalyzed by immobilized *Candida rugosa* lipase with Novozyme® 435 and Lipozyme® RM IM..... 37

3.4.10 Stability of immobilized lipase..... 37

3.4.11 Analysis of the fatty acid methyl ester..... 39

CHAPTER IV..... 41

4.1 Support selection..... 41

4.2 Optimization of immobilization of lipase..... 43

4.3 Transesterification and hydrolysis catalyzed by immobilized *Candida rugosa* lipase..... 55

4.4 Screening of raw materials for feedstock..... 56

4.5 Optimization of the transesterification reaction 60

4.6 Comparative studies of transesterification catalyzed by immobilized *Candida rugosa* lipase with Novozyme® 435 and Lipozyme® RM IM..... 65

4.7 Stability of immobilized *Candida rugosa* lipase..... 68

Page

CHAPTER V DISCUSSION 73

5.1 Support selection 73

5.2 Optimization of immobilization of lipase 75

5.3 Transesterification and hydrolysis catalyzed by immobilized *Candida rugosa* lipase 81

5.4 Screening of raw materials for feedstock 82

5.5 Optimization of the transesterification reaction 85

5.6 Comparative studies of transesterification catalyzed by immobilized *Candida rugosa* lipase with Novozyme® 435 and Lipozyme® RM IM 90

5.7 Stability of immobilized *Candida rugosa* lipase 92

CONCLUSION 96

REFERENCES 97

APPENDICES 115

Appendix A 116

Appendix B 117

Appendix C 118

Appendix D 121

Appendix E 124

Appendix F 130

Appendix G 133

BIOGRAPHY 134

LIST OF TABLES

Table		Page
2-1	Comparative properties of diesel and biodiesel	6
2-2	Comparison between alkali-catalyzed and lipase-catalyzed methods for biodiesel production	11
2-3	Classification of supports	16
2-4	Comparative methods for the immobilization of enzyme	20
4-1	The concentrations of various adjuvants with the highest activities of *Candida rugosa* lipase solution	51
4-2	Optimal conditions of lipase immobilization	54
4-3	Oil content of non-edible and waste plant seeds	56
4-4	Fatty acid composition, Saponification number (SN), Iodine value (IV), Cetane number (CN) and viscosity (η) of fatty acid methyl ester of non-edible and waste plant oils	59
A-1	Details of seven types of hydrophobic support for immobilization of *Candida rugosa* lipase	116
C-1	Composition for standard BSA	118
E-1	Retention time, peak area and peak height of standard fatty acid methyl ester, used in the calculation of fatty acid composition in oil	125
E-2	Fatty acid composition of palm oil	127
E-3	Molecular weight of non-edible and waste plant oil	128
G-1	Property of commercial lipase	133

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2-1	Different reactions catalyzed by lipase in aqueous and non-aqueous solutions	14
4-1	Yield of activity of the immobilization of lipase on hydrophobic supports	42
4-2	Support screening on transesterification of palm oil	43
4-3	The effect of pH on the lipase activity and activity yield (%) of lipase immobilization	44
4-4	The effect of ionic strength on the lipase activity and activity yield (%) of lipase immobilization	45
4-5	The effect of protein loading on (a) lipase activity and (b) % activity yield of lipase immobilization	46
4-6	The effect of immobilization time on the residual activity of lipase	48
4-7	The effect of temperature on the lipase activity and % activity yield of lipase immobilization	49
4-8	The effect of adjuvant types on the lipase activity (a) and % activity yield (b) of lipase immobilization	52
4-9	The effect of immobilized lipase with added various adjuvants types on transesterification reaction	53
4-10	Transesterification and hydrolysis catalyzed by immobilized lipase	55
4-11	The effect of addition mode on percentage of conversion to biodiesel	60
4-12	The effect of oil:methanol ratio on percentage of conversion to biodiesel	61
4-13	The effect of amount of enzyme on percentage of conversion to biodiesel	62
4-14	The effect of water content on percentage of conversion to biodiesel	63
4-15	The effect of time and temperature on percentage of conversion to biodiesel	64

Figure		Page
4-16	The percentage conversion of biodiesel from non-edible and waste oils catalyzed by 3 types of immobilized lipase.....	67
.4-17	Effect of temperature on thermo stability of immobilized *Candida rugosa* lipase.....	68
4-18	The half life time of immobilized *Candida rugosa* lipase.....	69
4-19	Operational stability of immobilized *Candida rugosa* lipase catalysis for transesterification.....	70
4-20	Stability of immobilized *Candida rugosa* lipase catalysis for hydrolysis.	71
C-1	Calibration curve for protein determination by Bradford's method.....	119
D-1	Thermostability of untreated immobilized enzyme.....	122
E-1	Chromatogram of methyl ester from transesterification catalyzed by NaOH and analyzed by gas chromatography.....	125
E-2	Molecular structure of triglyceride.....	126
E-3	Non-edible and waste plant oil.....	129
F-1	Transesterification of palm oil and methanol.....	130
F-2	Chromatogram of methyl ester from transesterification catalyzed by immobilized lipase and analyzed by high performance liquid chromatography.....	131

ABBREVIATIONS

°C	degree of celcius	min.	minute
cm	centimeter	ml	milliliter
cSt	centistoke	mM	millimolar
et al.	et alibi (latin), and others	mol	mole
g	gram	µg	microgram
hr.	hour	µl	microliter
kg	kilogram	N.D.	non-detectable
L	liter	nm	nanometer
m	meter	ppm	part per million
M	Molar	psi	pound (force) per square inch
max	maximum	s	second
mg	milligram	v/v	volume by volume
min	*minimum*	w/w, wt	weight by weight