ว.วิทย. มข. 44(1) 153-163 (2559) KKU Sci. J. 44(1) 153-163 (2016)

การคัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์เพื่อใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนในการผลิตไบโอดีเซล

Screening of bacteria and yeasts for transesterification biocatalyst in biodiesel production using waste cooking oil

กิจสิทธิ์ พรหมสุทธิ์[1*] มาริสา จาตุพรพิพัฒน์[1] และ อารี ฤทธิบูรณ์[1]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[*]Corresponding Author, E-mail: guy-secret@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะคัดเลือกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่แยกได้จากดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันรวมทั้งยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพื่อผลิตเป็นตัวเร่งชีวภาพของจุลินทรีย์ผสมเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 8 สายพันธุ์ ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม 7 สายพันธุ์ และยีสต์สายพันธุ์กลาย 1 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกเบื้องต้นด้วยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารแข็งที่มี Rhodamine B ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีโคโลนีสีชมพูอมส้ม จากนั้นคัดเลือกอีกครั้งในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB8 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสายพันธุ์อื่น คือมีค่าเท่ากับ 0.31, 0.34 และ 0.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายไปทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยการเลี้ยงเชื้อในน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนร่วมกับเอทานอลและเมื่อคำนวณปริมาณร้อยละการผลิตเอสเทอร์ที่ได้จากการฉีดส่วนใสบนสุดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วย GC-MS พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 และสายพันธุ์กลาย G47 มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้เป็นเอสเทอร์ได้ดีซึ่งมีร้อยละของปริมาณเอสเทอร์ เท่ากับร้อยละ 30.7, 12.2 และ 42.9 ตามลำดับ

Abstract

This research emphasized on screening and morphological study of lipase-producing bacteria and yeasts isolated from soil in the area of oil industry as well as lipase-producing mutant yeast. The strains with high lipase activity were conducted to use as mixed culture for being as biocatalyst in biodiesel production. The results found that 8 strains of bacteria, 7 strains of wild type yeast, and 1 strain of mutant yeast were obtained from primary screening by culturing in solid media containing 1 mg/ml of rhodamine B and waste cooking oil as carbon source at 30 $^{\circ}$C for 48 hr. The orange-pink colonies were selected and secondary screened in liquid media containing waste cooking oil as carbon source in order to determine for lipase activity. The results revealed that strain KPB8 (bacterium), KPY9 (wild type yeast), and G47 (mutant yeast) gave maximum lipase activity and had significantly value of 0.31, 0.34 and 0.4 U/mL, respectively at $p \leq 0.05$. After that, they were subjected to examine as biocatalyst in transesterification by culturing as mixed culture in waste cooking oil and ethanol. The percentage of ester produced from reaction was calculated after analyzed the supernatant by gaschromatography mass spectrometry (GC-MS). The result showed that isolate KPB10, KPY9 and G47 had ability for being good catalysts in transesterification which gave rise the percentage of esters of 30.7, 12.2 and 42.9, respectively.

คำสำคัญ: ไบโอดีเซล ตัวเร่งชีวภาพ โรดามีน บี ไลเปส ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

Keywords: Biodiesel, Biocatalyst, Rhodamine B, Lipase, Transesterification

บทนำ

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นพลังงานสะอาดที่ได้จากการนำน้ำมันจากพืชหรือน้ำมันจากสัตว์มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับโมเลกุลแอลกอฮอล์สายสั้นโดยมีกรด ด่าง หรือเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Gupta et al., 2007; Leelaruji et al., 2013) ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจที่เกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพ อีกทั้งยังเป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามการใช้กรดหรือด่างเพื่อเร่งปฏิกิริยาพบว่ามีข้อเสียมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนผลิตไบโอดีเซล (Leelaruji et al., 2013) ซึ่งกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งนั้นสามารถนำไปใช้ในสภาวะของปฏิกิริยาที่ไม่มีความรุนแรง และสามารถแยกกลีเซอรอลออกได้ง่ายโดยไม่มีสารประกอบเชิงซ้อนปะปน แต่เนื่องจากกระบวนการเตรียมของเอนไซม์ไลเปสมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และการตรึงเอนไซม์ค่อนข้างซับซ้อน จึงทำให้มีราคาสูง ซึ่งทางเลือกใหม่ของการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์นั้นคือ การใช้ตัวเซลล์ของจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งชีวภาพ

แทนเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ ซึ่งช่วยลดปัญหาด้านราคาในการใช้เอนไซม์ไลเปสในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Arabmarkadeh et al., 2014)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพจะสามารถลดต้นทุนของการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Fukuda et al., 2008) โดยได้มีการวิจัยและศึกษาทดลองซึ่งเป็นที่ยอมรับโดยใช้เซลล์ของ *Rhizopus oryzae* ที่ตรึงเซลล์ที่มีศักยภาพเป็นตัวเร่งชีวภาพในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Tan et al., 2010; Fukuda et al., 2001) และใช้เซลล์ของ *Escherichia coli* ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมมาใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งเมทานอลจะทำปฏิกิริยากับ rapeseed oil ได้เป็นไบโอดีเซลถึงร้อยละ 97.7 (Gao et al., 2009) ในขณะที่การใช้ตัวเซลล์ของ *Rhizopus oryzae* สามารถที่จะให้ผลิตภัณฑ์ของไบโอดีเซลถึงร้อยละ 80 (Tamalampudi et al., 2008) นอกจากนี้ได้มีการใช้ตัวเซลล์ของ *Rhodotorula mucilagenosa* P11I89 ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับ เมทานอลให้ผลิตภัณฑ์ของ Oleic methyl ester และ Fatty acid methyl ester ร้อยละ 64.12 และร้อยละ 51.26 ตามลำดับ (Srimhan et al., 2011)

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้ คือ ทำการศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากวัสดุประเภทดิน กากใยปาล์ม น้ำเสีย และทะลายปาล์มบริเวณโรงงานผลิตน้ำมัน ที่มีคุณสมบัติในการใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับเอทานอล เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตไบโอดีเซลโดยหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิต รวมทั้งลดอัตราค่าใช้จ่ายที่สูงสำหรับการใช้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์ วัตถุดิบ และสารเคมี

เชื้อแบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่คัดแยกจากวัสดุประเภทดิน กากใยปาล์ม น้ำเสีย และทะลายปาล์มจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันบริเวณแถบกรุงเทพมหานครและปริมณฑล และเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการทำการกลายพันธุ์โดยรังสีอัลตราไวโอเลต เอทิลเมทิลซัลโฟเนต และรังสีแกมมา (วรรณิสา และคณะ, 2557) โดยเก็บรักษาไว้ที่สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยการนำมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient agar (NA) และ Yeast malt agar (YMA) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ น้ำมันเหลือใช้ที่ได้จากครัวเรือน โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำมันถั่วเหลืองที่มีปริมาณของกรดไขมันอิสระคิดเป็นอัตราส่วนร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนักคือกรดปาล์มิติก กรดสเตียริก กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก และกรดลิโนเลนิคร้อยละ 11.8, 3.2, 23.3, 5.5 และ 6.3 ตามลำดับ (Azocar et al., 2010) รวมทั้งสารเคมีที่ใช้คือเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 (Mallinckrodt). Rhodamine B (Sigma). *p*-nitrophenol (Sigma). และ *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) (Sigma).

2. การคัดเลือกเบื้องต้น (Primary screening) ของเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง

เชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ที่แยกจากดินและตัวอย่างอื่นๆ จากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันนำมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) และ Yeast malt agar (YMA) ที่มีการใช้น้ำมันเหลือใช้ใน

ครัวเรือนร้อยละ 1 และมีการเติม Rhodamine B ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Kumar et al., 2012) ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยคัดเลือกโคโลนีที่มีสีชมพูอมส้ม

3. การคัดเลือกขั้นที่สอง (Secondary screening) ของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ไลเปสโดยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลว

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ (KPB1, KPB3, KPB5, KPB6, KPB7, KPB8, KPB9 และ KPB10) และยีสต์ 7 สายพันธุ์ (KPY9, KPY11, KPY14, KPY21, KPY29, KPY33 และ KPY42) รวมทั้งยีสต์สายพันธุ์กลาย 1 สายพันธุ์ (G47) ที่ได้จากการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) และ Yeast malt broth (YMB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนประเภทน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งผ่านการทำอาหารมาครั้งเดียวร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและส่วนประกอบอื่นๆเป็นกรัมต่อลิตรดังนี้คือ Peptone 0.5, Yeast extract 0.5, NaCl 0.05, $CaCl_2$ 0.005 และอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นกรัมต่อลิตรดังนี้คือ Glucose 2, Peptone 5, $MgSO_4$ 0.1, K_2HPO_4 1 โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Silva et al., 2005) และ 48 ชั่วโมง (Kumar et al., 2005) สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ ตามลำดับ แล้วทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้เอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเอนไซม์สกัดหยาบ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมกับ 0.9 มิลลิลิตรของ *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) ปริมาตร 3 มิลลิกรัมละลายใน iso-propanal ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Tris-HCl buffer pH 8.0 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร Triton X-100 40 มิลลิกรัม และ Arabic gum ปริมาตร 10 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (Silva et al., 2005) โดยหนึ่งหน่วยของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 1 ไมโครโมลของ *p*-nitrophenol ที่ปล่อยจาก *p*-nitrophenyl ใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

4. การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือก

น้ำมันที่ผ่านการกรองปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำมาทำการฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 0.932 มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราส่วนโมลต่อโมลของน้ำมันต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 4 ผสมใส่ในขวด จากนั้นทำการเติมตัวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อทำการแยกส่วนใส ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสส่วนบนสุดที่ได้ ไปทำการวิเคราะห์ร้อยละของปริมาณเอสเทอร์โดยใช้ methyl heptadecanoate เป็นสารมาตรฐาน (internal standard) ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสเปกโตรเมทรี (Gas chromatography Mass spectrometry) โดยการใช้คอลัมน์ DB-wax ความยาว 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร (I.D.) x 0.25 ไมโครเมตร โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่สภาวะอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 3 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิของ injector 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ oven

เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส เพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 250 องศาเซลเซียส และอัตราการ Split ที่ 20 : 1 และสภาวะของ MS (Mass Spectrometry) ใช้แหล่งกำเนิดไอออนแบบ EI (Electron Impact) อุณหภูมิของ MS Source ที่ 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ MS quadrupole ที่ 150 องศาเซลเซียส และการเก็บข้อมูลแบบสแกน (scan mode) โดยเลือกใช้ช่วงสแกนตั้งแต่ 30 ถึง 500 amu. (atomic mass unit) โดยคำนวณปริมาณไบโอดีเซลตามมาตราฐาน BS EN 14103:2003 (พุฒิพัฒน์, 2555) ซึ่ง C คือร้อยละโดยน้ำหนักของปริมาณเอทิลเอสเทอร์ $\sum A$ คือ พื้นที่ใต้โครมาโทแกรมทั้งหมดของเอทิลเอสเทอร์ A_{IS} คือพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมของ methyl heptadecanoate C_{IS} คือ ความเข้มข้นของ internal standard V_{IS} คือ ปริมาตรของ internal standard (มิลลิลิตร) W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ดังสมการ (1)

$$C\ (\%) = \frac{\sum A - A_{IS}}{A_{IS}}\ x\ \frac{C_{IS}\ x\ V_{IS}}{W}\ x\ 100 \qquad (1)$$

5. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เพื่อนำไปใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพของจุลินทรีย์ผสมในการผลิตไบโอดีเซล โดยศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนและ Rhodamine B ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Kumar et al., 2012) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

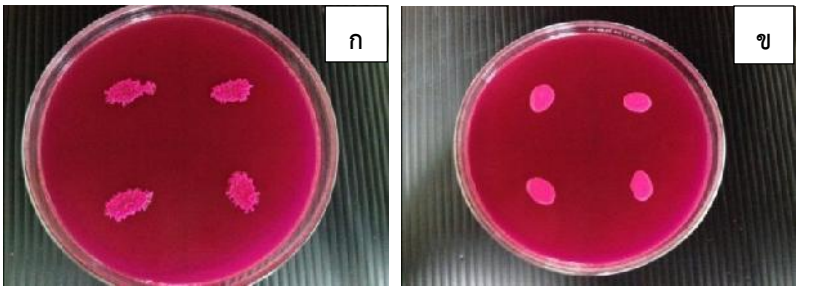
6. การวางแผนการทดลองและสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำและวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย one-way ANOVA ค่าความแปรปรวนของข้อมูล เมื่อค่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) วิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS (เวอร์ชัน 8.0)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการคัดเลือกเบื้องต้น (Primary screening) ของเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารแข็ง

จากการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้นที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะอาหารแข็งซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือน และ Rhodamine B พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB1, KPB3, KPB5, KPB6, KPB7, KPB8, KPB9 และ KPB10 เชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9, KPY11, KPY14, KPY21, KPY29, KPY33 และ KPY42 สายพันธุ์กลาย G47 มีลักษณะโคโลนีสีชมพูอมส้ม เมื่อส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต หรือภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ (Kumar et al., 2012) เนื่องจากเชื้อมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและสามารถไฮโดรไลซิสสารตั้งต้นซึ่งเป็นน้ำมันกับ Rhodamine B ได้ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ ซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีชมพูอมส้ม ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar สำหรับแบคทีเรีย และ ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar สำหรับยีสต์ ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนร้อยละ1 และ Rhodamine B ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

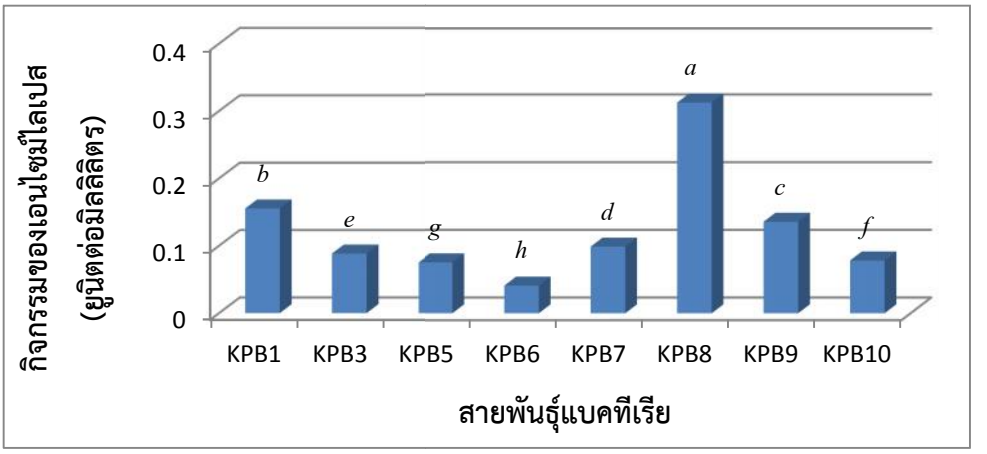
2. การคัดเลือกขั้นที่สอง (Secondary screening) ของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว

จากการทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยทำการนำส่วนใส ซึ่งเป็นเอนไซม์ไลเปสสกัดหยาบของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB8 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดเท่ากับ 0.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ดังแสดงตามรูปที่ 2 ซึ่งค่าที่ได้มีความใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus coagulan* BTS-3 ที่มีการใช้น้ำมันมะกอก (Olive oil) เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Kumar *et al.*, 2005) และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 กับสายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดคือเท่ากับ 0.40 และ 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ดังแสดงดังรูปที่ 3 และแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula mucilagenosa* P11I89 โดยการใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 1.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Srimhan et al., 2011)

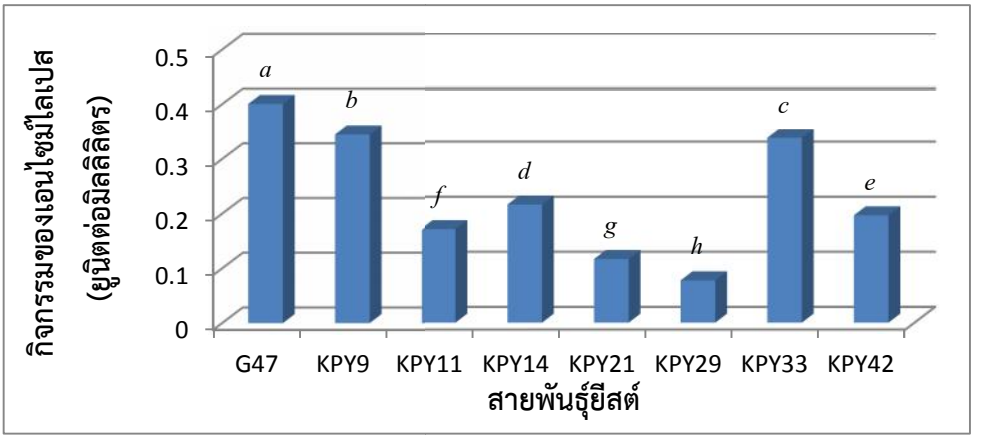
3. ผลการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือก

ผลการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเชื้อแบคทีเรียกับยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและยีสต์สายพันธุ์กลายด้วยเครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟี แมสเปกโตรเมทรี โดยคำนึงถึงปริมาณของ เอสเทอร์ที่ได้ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 จะมีค่าของเอสเทอร์มากที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่นคือเท่ากับร้อยละ 30.7 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ รองลงมาคือสายพันธุ์ KPB1 เท่ากับร้อยละ 26.3 เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณที่สูงซึ่งส่งผลในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแล้วให้ปริมาณเอสเทอร์ที่สูง (Matsumoto et al., 2001; Matsumoto *et al.*, 2002) ซึ่งแตกต่างจากการใช้เซลล์ของ *Escherichia coli* ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพระหว่างเมทานอลทำปฏิกิริยากับ rapeseed oil ได้เป็นไบโอดีเซลร้อยละ

97.7 (Gao et al., 2009) ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 จะมีค่าของเอสเทอร์มากที่สุดคือเท่ากับร้อยละ 12.2 รองลงมาคือสายพันธุ์ KPY42 เท่ากับร้อยละ 11 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 ให้ค่าเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 42.9 ดังตารางที่ 1 ซึ่งแตกต่างจากการใช้เซลล์ของ *Rhodotorula mucilagenosa* P11I89 ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลได้เป็นไบโอดีเซลร้อยละเท่ากับ 51.26 (Srimhan et al., 2011) ทั้งนี้การใช้ตัวเซลล์จุลินทรีย์เป็นตัวเร่งชีวภาพแทนการใช้เอนไซม์ไลเปสสามารถลดผลของแอลกอฮอล์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ (Srimhan et al., 2011)



รูปที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



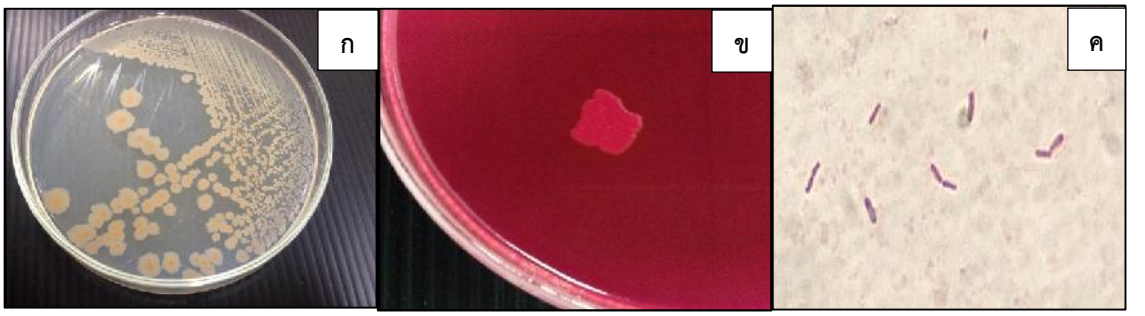
รูปที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ผลของร้อยละปริมาณเอสเทอร์ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสเปกโตรเมทรีเมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนกับเอทานอลบริสุทธิ์ที่อัตราส่วนของน้ำมันต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

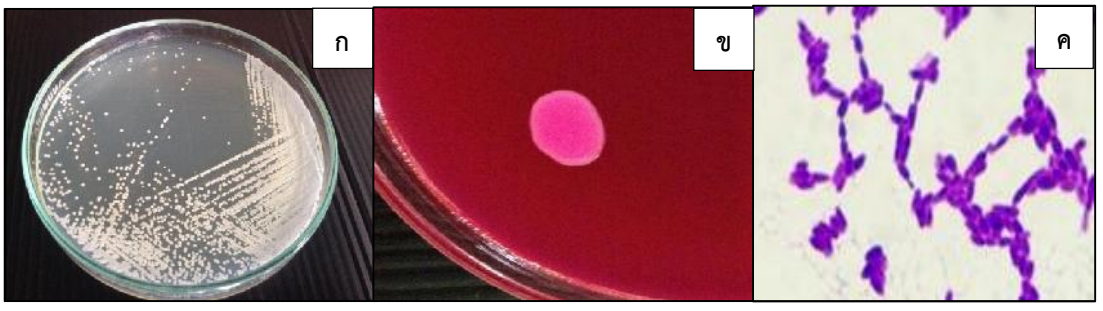
เชื้อยีสต์	ร้อยละของปริมาณเอสเทอร์	เชื้อแบคทีเรีย	ร้อยละของปริมาณเอสเทอร์
G47	42.9^{a}	KPB1	26.3^{c}
KPY9	12.2^{i}	KPB3	23.5^{d}
KPY11	10.5^{ij}	KPB5	18.4^{g}
KPY 14	10.7^{ij}	KPB6	17.9^{g}
KPY 21	8.4^{l}	KPB7	21.3^{f}
KPY 29	9.4^{jk}	KPB8	15^{h}
KPY 33	9.4^{jk}	KPB9	23^{ef}
KPY 42	11^{ij}	KPB10	30.7^{b}

4. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือก

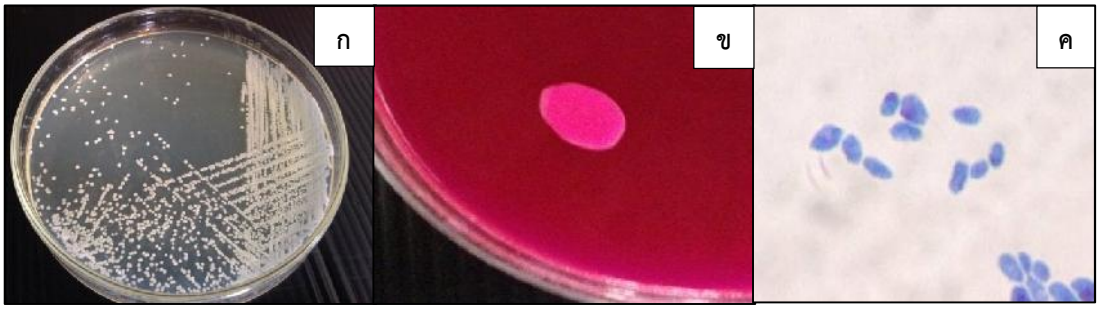
จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนและ Rhodamine B และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงในรูปที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ



รูปที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีแกรมบวก เซลล์รูปท่อนเรียงตัวเป็นสายยาว ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวส้มขุ่น ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว ก) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ข) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนและ Rhodamine B และ ค) รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์สายพันธุ์ KPY9 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีของ Methyleen blue เซลล์รูปวงรี ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวขุ่นนูน ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว ก) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar ข) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนและ Rhodamine B และ ค) รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีของ Methyleen blue เซลล์รูปวงรี ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวขุ่นนูน ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว ก) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar ข) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนและ Rhodamine B และ ค) รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ด้วยสภาวะอาหารแข็งและอาหารเหลวจากการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อสร้างขึ้นพบว่าค่าของกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียสูงสุดคือสายพันธุ์ KPB8 ซึ่งมีค่าของกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และของเชื้อยีสต์คือสายพันธุ์ G47 และKPY9 ซึ่งมีค่าของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.40 และ 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้งหมดมาทำการทดสอบปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนและแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ พบว่าปริมาณของเอสเทอร์ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี โดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสเปกโตรเมทรี พบว่าเชื้อแบคทีเรีย KPB10 เชื้อยีสต์ KPY9 และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 มีค่าของปริมาณเอสเทอร์ร้อยละ 30.7, 12.2 และ 42.9 ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

พุฒิพัฒน์ เบญจปรีชาพัฒน์. (2555). การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงบนมอนต์มอริสโลไนต์. ปริญญานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ: 173 หน้า

วรรณิสา ปั้นสุข อารี ฤทธิบูรณ์ และ มาริสา จาตุพรพิพัฒน์. (2557). การแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล. ใน: เรื่องเต็มการประชุมวิชาการครั้งที่ 52. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 60-67.

Arabmarkadeh, A., Jalili, F., and Chegini, P. (2014). Use of loofa-Immobilized *Rhizopus oryzae* as a whole-cell biocatalyst in batch and packed-bed bioreactor. Switzerland Research Park Journal 103(1): 671-676.

Azocar, L., Ciudad, G., Heipieper, J., H., Navia, R. (2010). Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils: A review. Appl Microbiol Biotechnol 88: 621-636.

Fukuda, H., Hama, S., Tamalampudi, S., and Noda, H. (2008). Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production: A review. Trends in Biotechnology 26(12): 668-673.

Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering 92(5): 405-416.

Gao, B., Su, E., Lin, J., Jing, Z., Ma, Y., and Wei, D. (2009). Development of recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Proteus* sp. for biodiesel production. Journal of Biotechnology 139: 169-175.

Gupta, N., Shai, V., and Gupta, R. (2007). Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. Process Biochemistry 42: 518-526.

Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., and Gupta, V. K. (2012). Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. Archives of Applied Science Research 4(4): 1763-1770.

Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., and Gupta, R. (2005). Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. Protein Expression and Purification 41: 38-44.

Leelaruji, W., Piamtongkam, R., Chulalaksananukul, S., and Chulalaksananukul, W. (2013). Biodiesel production from *Jatropha curcas* oil catalyzed by whole cells of *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3. African Journal of Biotechnology 12(27): 4380-4386.

Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H., and Kondo, A. (2001). Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular over-production of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. Apply Microbial Biotechnology 57: 515-520.

Matsumoto, T., Takahashi, S., Ueda, M, Tanaka, A., Fukuda, H., and Kondo, A. (2002). Preparation of high activity yeast whole cell biocatalysts by optimization of intracellular production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. Journal of Molecular Catalysis B :Enzymatic 17: 143-149.

Silva, W. O. B., Mitidieri, S., Schrank, A., and Vainstein, M. H. (2005). Production and extraction of

an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Process Biochemistry 40: 321-326.

Srimhan, P., Kongnum, K., Tawee-rodjanakarn, S., and Hongpattarakere, T. (2011). Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil trans-esterification. Enzyme and Microbial Technology 48: 293-298.

Tamalampudi, S., Talukder, M. R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A., and Fukuda, H. (2008). Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. Biochemical Engineering Journal 39: 185-189.

Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., and Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review, Biotechnology Advances 28: 628-634.

❑❑❑❑❑