บทความวิจัย

การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงอาหาร: การประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียและผลิตไบโอดีเซล

กุสุมาวดี ฐานเจริญ*

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

บทคัดย่อ

การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจากดิน และน้ำทิ้งบริเวณโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏ-มหาสารคามที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันสามารถคัดเลือกเชื้อทั้งหมดจำนวน 74 ไอโซเลต จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อทำการคัดกรองเชื้อยีสต์ทั้ง 74 ไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween agar plate พบว่า มีเชื้อยีสต์ 3 ไอโซเลต ได้แก่ CTWY29, CTWY11 และ CTWY02 ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์สูงสุด โดยพบการสร้างวงใสรอบโคโลนี เท่ากับ 12, 18 และ 6 มิลลิเมตร ตามลำดับ การทดสอบการย่อยไขมันในน้ำทิ้งพบว่า เชื้อรหัส CTWY29 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดทั้งในน้ำทิ้งสังเคราะห์และน้ำทิ้งจริงจากโรงอาหารเท่ากับ 1.431 และ 1.261 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อย 72.69% ในน้ำทิ้งโรงอาหารหลังจากเวลา 96 ชั่วโมง นอกจากนี้ยีสต์ที่มีความสามารถย่อยไขมันดังกล่าว ยังสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ 3 ชนิดหลัก คือ เมทิลปาล์มมิเตท เมทิลลิโนเลเอท และเมทิลโอเลเอท เท่ากับ 20.46, 5.22 และ 9.30% ตามลำดับ จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อรหัส CTWY29 มีความน่าสนใจในการเป็นศักยภาพในการผลิตไลเปส เพื่อการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสมในระดับห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ: การคัดเลือก ไลเปส น้ำทิ้ง ไบโอดีเซล และ ไขมัน

* ผู้เขียนให้ติดต่อ: E-mail: Kthancharoen@gmail.com/Tel: 085-7711631

Screening of Lipase-producing Yeasts from Canteen Wastewater: Their Applications in Wastewater Treatment and Biodiesel Production

Kusumawadee Thancharoen*

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University, Maha Sarakham, 44000, Thailand

Abstract

Total 74 yeast isolates were screened for lipase production from the oil contaminated in soil and water in canteen of Rajabhat Maha Sarakham University using the enrichment medium supplemented with olive oil as a sole carbon source. There isolates (CTWY29, CTWY11 and CTWY02) were evaluated highest clear zone on Tween agar plate after cultured on the Tween agar plate, gave 12, 8 and 6 mm., respectively. The lipid decomposition testing in synthetic wastewater and canteen wastewater were 1.431 and 1.261 Unit/ml obtained CTWY29 and efficiency lipid digested 72.69% in canteen wastewater after 96 hours, Furthermore lipase-producing yeast can be release 3 methyl ester was found that methyl palmitate, methyl linoleate and methyloleate were 20.46, 5.22 and 9.30%, respectively. The results demonstrate that CTWY29 is interesting for potential of lipase production in order to biodiesel at the optimized for laboratory level.

Keywords: Selection, Lipase, Wastewater, Biodiesel and Lipid

* Corresponding author: E-mail: Kthancharoen@gmail.com/Tel: 085-7711631

บทนำ

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่มีแหล่งผลิตหลากหลาย เช่น สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ซึ่งสัตว์จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ที่ตับอ่อน เอนไซม์ไลเปสจากพืชได้จากน้ำยางมะละกอ เมล็ดข้าวโอ๊ต และเมล็ดละหุ่ง การผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เร็วและเลี้ยงง่าย นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมได้ และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตได้ง่าย การแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถแยกจากแหล่งดินทั่วไป โรงงานเนื้อสัตว์ แหล่งบำบัดน้ำทิ้งจากโรงอาหาร และระบบบำบัดน้ำทิ้งตามบ้านเรือน (Pepper and Perlmem, 1976) เอนไซม์ไลเปสมีความน่าสนใจในทางการค้า เนื่องจากสามารถนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น โอเลโอเคมี สารซักฟอก อุตสาหกรรมกรดอินทรีย์ อุตสาหกรรมหนังสัตว์ การบริหารจัดการสิ่งแวดล้อม เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมน้ำหอม อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง และเชื้อเพลิงชีวภาพ (Rekha *et al*, 2012) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Bacillus thermoleovorans*, *Burkholderia cepacia*, *Candida antarctica*, *C. cylindracea*, *C. rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Fusarium heterosporum*, *F. oxysporum*, *Getrichum candidum, Humicola lanuginose*, *Oosporalactis* lactis, *Penicillium cyclopium*, *P. roqueforti*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. chinensis, R. circinans*, *R. delemr*, *R. fusiformis*, *R. japonicas* NR400, *R. oryzae*, *R. stolonifer* NRRL1478, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus hyicus*, *Thermomyces lanuginose* ซึ่งพบว่า *C. antarctica*, *C. rugosa*, *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *Rhi. miehei*, *R. chinensis*, *R. oryzae* และ *T. lanuginosa* จุลินทรีย์เหล่านี้มีการผลิตไลเปสที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับปฏิกิริยา ทรานสเอสเทอร์-ฟิเคชั่น (Transesterification) (Vasudevan and Briggs, 2008) น้ำมันหรือไขมันที่ปะปนมากับน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมภัตตาคารร้านอาหารบ้านพักอาศัยนับเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดมลภาวะน้ำเน่าเสียของลำน้ำสาธารณะ เนื่องจากไขมันที่ปะปนออกมานั้นจะเคลือบที่ผิวหน้าของน้ำทิ้งทำให้เกิดความไม่น่าดู และจะเป็นการปิดกั้นผิวหน้าน้ำไม่ให้อากาศผ่านเข้าไปผสมกับน้ำได้ ซึ่งมีผลต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำการแยกน้ำมันหรือไขมันออกจากน้ำทิ้งสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ การเลือกใช้วิธีการกำจัดไขมันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายประการ เช่น ปริมาณ สภาพชนิดของน้ำมันหรือไขมัน การกำจัดไขมันด้วยวิธีทางกายภาพเช่น ถังดักไขมันเป็นที่นิยมใช้กันมาก แต่ก็ก่อให้เกิดปัญหาตามมาในเรื่องของกากไขมันที่มาจากการแยกไขมันออกจากน้ำทิ้งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ภายหลัง ปัจจุบันระบบบำบัดน้ำทิ้งที่ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งชุมชนและอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่จะใช้ระบบบำบัดน้ำทิ้งทางชีวภาพเป็นระบบที่ใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งทำให้ปริมาณสารต่าง ๆ ลดน้อยลง แต่ในบางครั้งการบำบัดน้ำทิ้งโดยอาศัยจุลินทรีย์ในน้ำทิ้งเพียงอย่างเดียวก็ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำทิ้งมีสารอินทรีย์หลายชนิด แต่การย่อยสลายโดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสารอินทรีย์แตกต่างกัน ดังนั้นหากมีการใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันหรือไขมันลงไปน่าจะเป็นการช่วยส่งเสริมให้ระบบบำบัดน้ำทิ้งนี้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น การใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำมันหรือไขมันในน้ำทิ้งเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง และได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ (Sombatsomphop *et al*., 2011) การบำบัดไขมันและน้ำมันด้วยกระบวนการทางชีวภาพได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันด้วยวิธีการย่อยสลายแบบใช้อากาศ ซึ่งเป็นการอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์ไลเปสในการย่อยไขมันและน้ำมันในรูปไตรกลีเซอไรด์ แล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอลกับกรดไขมันที่จุลินทรีย์สามารถดูดซึมเพื่อใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ผ่านวิถีเบต้าออกซิเดชั่น (ß-oxidation pathway) เพื่อให้ได้พลังงานออกมาใช้ในการเจริญเติบโต การเลือกใช้จุลินทรีย์กลุ่มยีสต์มีข้อดีหลายประการ คือ ยีสต์มีความสามารถในการรองรับการบำบัดน้ำ

ทิ้งที่มีสารอินทรีย์ความเข้มข้นสูง และองค์ประกอบที่เป็นไขมันและน้ำมันจากอุตสาหกรรมอาหารและอื่น ๆ ได้ โดยสารอินทรีย์ในน้ำทิ้งจะเปลี่ยนไปอยู่รูปชีวมวลของยีสต์ที่มีน้ำหนักเซลล์สูง สามารถตกตะกอนได้เองตามแรงโน้มถ่วง จึงสารมารถแยกออกจากน้ำทิ้งได้ง่าย และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อในการเป็นอาหารเสริมโปรตีน และวิตามินของสัตว์ได้ (Nonthirach and Puengratsamee, 2011) จากรายงานของ Chigusa *et al*. (1996) ได้คัดแยกยีสต์จากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตน้ำมัน และโรงงานผลิตอาหาร พบว่าสามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ 9 ไอโซเลต จากการเจริญบนอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไขมันในน้ำทิ้งสังเคราะห์ พบว่าเชื้อในรูปผสมสามารถลดปริมาณไขมันได้มากกว่า 94% ภายในเวลา 7 วัน และเมื่อนำเชื้อผสมดังกล่าวมาทดลองศึกษาการย่อยสลายไขมันจากโรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลืองในระดับโรงงานเป็นเวลา 1 ปี พบว่าสามารถลดปริมาณไขมันจาก 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เหลือเพียง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงจากน้ำทิ้งโรงอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม เพื่อนำมาใช้บำบัดไขมันในน้ำทิ้งและใช้ในการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นปฐมภูมิ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ในสูตรอาหาร YM broth (ประกอบด้วย Dextrose 10 กรัมต่อลิตร, Yeast extract 3 กรัมต่อลิตร, Malt extract 5 กรัมต่อลิตร, Peptone 5 กรัมต่อลิตร และน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 4 และเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ดัดแปลงจาก Thabet *et al*., 2012) โดยแบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 90 มิลลิลิตร) เก็บตัวอย่างดินและน้ำทิ้งจากโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามจำนวน 5 จุด เติมตัวอย่างดิน 10 กรัม และน้ำทิ้ง 10 มิลลิลิตร ลงใน YM broth บ่มบนเครื่องเขย่า อัตราการให้อากาศ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างหลังการบ่มมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar plate (ประกอบด้วย Yeast extract 3 กรัมต่อลิตร, Malt extract 5 กรัมต่อลิตร, Peptone 5 กรัมต่อลิตร, Dextrose 10 กรัมต่อลิตร, Agar 20 กรัมต่อลิตร และน้ำกลั่น 1 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Cross streak บน YM agar plate อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดี่ยว (Single colony) ใน YM agar slant (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นขั้นทุติยภูมิ

เตรียมหัวเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 7 มิลลิลิตร บ่มที่เครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็วรอบการเขย่า150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (กำหนดค่า OD เริ่มต้นเท่ากับ 1.0) นำกระดาษกรองปลอดเชื้อจุ่มลงเชื้อที่บ่มไว้ แล้วนำไปวางไว้บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween agar (ประกอบด้วย Tween 80 ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร และ agar 25 กรัมต่อลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เททับด้วยไอโอดีนความเข้มข้น 0.1 N บันทึกผลการทดลองโดยการวัดบริเวณใสที่เกิดขึ้น คำนวณความสามารถในการผลิตเอนไซม์ดังนี้ (Supajatturat *et al*., 2007)

$$\text{ดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี}}$$

3. การเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส

3.1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

เตรียมเชื้อยีสต์ 1 loop ลงในอาหาร YM medium 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้บ่มที่เครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็วรอบการเขย่า150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดึงส่วนใสออกแล้วเติมน้ำกลั่น ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นอีกครั้ง นำตะกอนที่อยู่ก้นหลอดผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% (w/v) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

(กำหนดค่า OD เริ่มต้น เท่ากับ 1.0) (Nonthirach and Puengratsamee, 2011)

3.2 การทดสอบการย่อยไขมันและการผลิตเอนไซม์ไลเปสในน้ำทิ้งสังเคราะห์

เตรียมน้ำทิ้งสังเคราะห์ (ประกอบด้วย Peptone 0.6 กรัม, Beef extract 0.4 กรัม, Urea 0.1 กรัม, K_2HPO_4 0.1 กรัม, NaCl 0.03 กรัม, $CaCl_2$ 0.014 กรัม, KCl 0.014 กรัม, $MgSO_4$ 0.01 กรัม, น้ำกลั่น 2 ลิตร) นำน้ำเสียสังเคราะห์ 45 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว 5 มิลลิลิตร วัดค่า pH = 7 แล้วเติมหัวเชื้อยีสต์ที่เตรียมในข้อที่ 3.1 จำนวน 5 มิลลิลิตร และทำชุดควบคุมที่มีน้ำทิ้งสังเคราะห์ 90 มิลลิลิตร และน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว 10 มิลลิลิตร แต่ไม่เติมเชื้อยีสต์ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็วรอบการเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 0, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปสและน้ำหนักเซลล์แห้ง (Wattanaying *et al*., n.d.)

3.3 การทดสอบการย่อยไขมันและการผลิตเอนไซม์ไลเปสในน้ำทิ้งจริง

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามปริมาตร 150 มิลลิลิตร วัดค่า pH และอุณหภูมิ เติมหัวเชื้อยีสต์จำนวน 15 มิลลิลิตร และทำชุดควบคุมที่มีน้ำทิ้ง 150 มิลลิลิตร (ไม่เติมเชื้อยีสต์) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างทุก ๆ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

4. การวิเคราะห์

4.1 การวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

ตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสับสเตรทปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เตรียมสับสเตรทโดยใช้ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตท 0.03 กรัม ละลายในไดโพรพานอล 10 มิลลิลิตร และโซเดียมดีออกซีโคเลต 0.207 กรัม ผสมกับกัมอราบิค 0.1 กรัม ละลายในทริสไฮโดรคลอลิกบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ (pH = 8) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณจากสูตรที่ได้จากกราฟมาตรฐานของไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตท กำหนดให้ไลเปส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณของไลเปสที่สามารถผลิตได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 10 นาที และ pH = 8 (Thabet *et al*., 2012)

4.2 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง

ตัวอย่าง (ตะกอน) ลงในถาดอะลูมิเนียมฟอยล์ที่อบแล้วที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคำนวณหาน้ำหนักของตัวอย่างที่แท้จริงโดยใช้สมการ ดังนี้ (Thabet *et al*., 2012)

น้ำหนักตัวอย่างที่แท้จริง (กรัม) =
(น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ-น้ำหนักฟอยล์) - (น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ-น้ำหนักฟอยล์)

4.3 การวิเคราะห์ไขมันที่เหลือและประสิทธิภาพการย่อยน้ำทิ้งที่มีไขมัน

วิเคราะห์ไขมันที่เหลือในน้ำทิ้งตามวิธีของ APHA, AWWA, WEF, (2012) เพื่อคำนวณปริมาณไขมันที่ถูกย่อยและประสิทธิภาพในการย่อยไขมันจากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ ประสิทธิภาพในการย่อยไขมันคำนวณได้จากความสามารถในการย่อยไขมันของยีสต์ คำนวณได้จาก

$$At = \{(Bt/B0)-(Ct/C0)\} \times 100$$

เมื่อ At = ความสามารถในการย่อยไขมันของยีสต์ที่เวลาใด ๆ (%)

B0 = ค่าเฉลี่ยของความหนาชั้นไขมันในชุดทดสอบเริ่มต้น (มิลลิเมตร)

Bt = ค่าเฉลี่ยของความหนาชั้นไขมันที่หายไปในชุดทดสอบที่เวลาใด ๆ (มิลลิเมตร)

C0 = ค่าเฉลี่ยของความหนาชั้นไขมันในชุดควบคุมเริ่มต้น (มิลลิเมตร)

Ct = ค่าเฉลี่ยของความหนาชั้นไขมันที่หายไปในชุดควบคุมที่เวลาใด ๆ (มิลลิเมตร)

Source: (Jitpirom and Sangaroon, 2012)

5. การผลิตไบโอดีเซล

ดำเนินการผลิตไบโอดีเซลตามคำแนะนำจาก Hongpattarakeeree and Chiensin (2005) โดยมีขั้นตอนการดำเนินการ ดังนี้

5.1 การเตรียมเซลล์ยีสต์

เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำมันปาล์ม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นสับสเตรท บ่มบนเครื่องเขย่าต่อเนื่อง อัตราการให้อากาศ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับเซลล์ยีสต์ด้วย Haemacytometer (กำหนดความเข้มข้นเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ถ่ายเชื้อลงในอาหารชนิดเดิม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าต่อเนื่อง อัตราการให้อากาศ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับเซลล์ยีสต์อีกครั้ง (กำหนดความเข้มข้นเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1 x 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสออกให้หมด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสออก และนำเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อสกัดกรดไขมันออกจากตัวอย่างต่อไป

5.2 การทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน

น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ (ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชัน) ปริมาตร 0.5 กรัม ผสมกับเมทานอลปริมาตร 0.054 กรัม (อัตราส่วน 1:3 โมล) รวม 0.554 กรัม เติมลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์เข้มข้น 1 x 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็วรอบการเขย่า150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-mass spectrometer (GCMS-QP2010 Shimadzu, Japan)

5.3 วิเคราะห์หาเมทิลเอสเทอร์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมส สเปกโตรมิเตอร์

ทำกราฟมาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานโดยการชั่งน้ำหนักที่แน่นอนนำมาเปรียบเทียบกับเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ในข้อ 5.2 โดยนำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่อง Gas Chromatography-mass spectrometer (GCMS-QP2010 Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ชนิด Select Biodiesel for Flame, length 30 m., 320 µm ID, 0.25 µm film thickness สภาวะที่ใช้ คือ ที่อัตราไหลของแก๊สพาเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะตู้อบมีอุณหภูมิเริ่มต้น 210 องศาเซลเซียส คงที่ 12 นาที และเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส คงที่ 8 นาที ตรวจวัดสัญญาณของสารด้วยตัวตรวจวัดชนิด Electron Ionization ผลการทดลองคำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟของ peak ซึ่งนำมาหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในตัวอย่างได้ โดยการเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของ peak เมทิลเอสเทอร์มาตรฐานที่ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนในแต่ละความเข้มข้น (Samniang *et al*., 2014)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการวิจัย

1.1 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นปฐมภูมิ

การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บจากโรงอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามบริเวณที่แตกต่างกันจำนวน 5 จุดสามารถคัดแยกยีสต์จำนวนทั้งหมด 74 ไอโซเลต สัณฐานวิทยาของเชื้อยีสต์จากน้ำทิ้งและดินที่น้ำทิ้งไหลผ่านโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามพบว่าเชื้อยีสต์มีลักษณะของโคโลนี และรูปร่างเซลล์ที่แตกต่างกันทั้งหมด 74 ไอโซเลต โดยยีสต์ที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่มีรูปแบบโคโลนีกลม (Circular) นูนตรงกลางเล็กน้อย (Undulate) ขอบเรียบ (Entire) สีครีม (Cream) ผิวมีลักษณะเรียบ (Smooth) ความโปร่งแสงเป็นแบบไม่สะท้อนแสง (Dull) และมีรูปร่างเซลล์แบบกลมรี (Ellipsoidal)

1.2 ผลการศึกษาการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นทุติยภูมิ

คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยพิจารณาจากความสามารถในการสร้างวงใส บนอาหารสูตร Tween agar (Fig. 1)

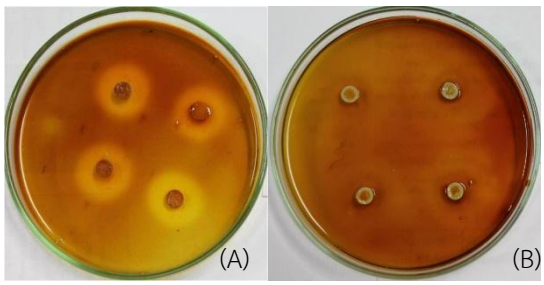

Fig. 1 Clear zone on Tween agar plate (A) lipase producing yeast (B) non-lipase producing yeast

Table 1 Clear zone of lipase producing yeasts

No.	Isolate	Colony size (mm.)	Diameters of clear zone (mm.)	Colony size/diameters of clear zone (mm.)
1	CTWY29	7	19	12
2	CTWY11	5	13	8
3	CTWY02	8	14	6
4	CTWY63	8	13	5
	CTWY51	7	12	5
	CTWY65	7	12	5
	CTWY35	9	14	5
5	CTWY34	7	11	4
	CTWY61	8	12	4
	CTWY49	7	11	4
6	CTWY09	11	14	3
7	CTWY16	9	10	1

จาก Table 1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 12 ไอโซเลตจากยีสต์ทั้งหมด 74 ไอโซเลต โดยไอโซเลตที่สามารถผลิตวงใสได้กว้างสูงสุด 3 อันดับแรก คือ รหัส CTWY29, CTWY11 และ CTWY02 มีค่าเท่ากับ 12, 8 และ 6 ตามลำดับ

ยีสต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลตมีรูปแบบสัณฐานวิทยาของโคโลนีบนอาหารแข็งและรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่แตกต่างกัน ดังนี้

CTWY02 – รูปร่างเซลล์แบบกลมรี ลักษณะโคโลนีขอบเรียบ เนื้อโคโลนีเรียบ นูนตรงกลางเล็กน้อย สีครีม และมีความโปร่งแสง

CTWY11 – รูปร่างเซลล์แบบกลมรี ลักษณะโคโลนีขอบเรียบ เนื้อโคโลนีเรียบ นูนตรงกลางเล็กน้อย สีครีม และไม่สะท้อนแสง

CTWY29 – รูปร่างเซลล์แบบกลมรี ลักษณะโคโลนีขอบเรียบ เนื้อโคโลนีเรียบ นูนตรงกลางเล็กน้อย สีครีม และมีความโปร่งแสง

ลักษณะของสัณฐานวิทยาระหว่างเชื้อยีสต์รหัส CTWY02 และ CTWY29 จะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ แต่ขนาดของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีความแตกต่าง เนื่องจากยีสต์รหัส CTWY02 มีขนาดของเซลล์ใหญ่กว่า CTWY29 (Fig. 2)

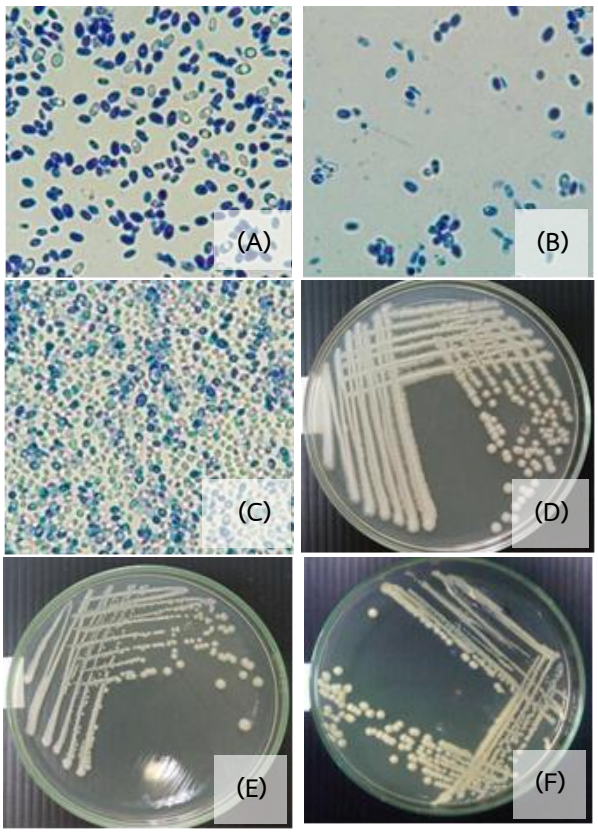

Fig. 2 Cell shape of yeasts under microscope (1000X) (A-C) and colony characteristics on YM agar plate (D-F) of CTWY02, CTWY11 and CTWY29

1.3 การย่อยน้ำทิ้งที่มีไขมัน

1) ผลการวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปสและน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ในน้ำทิ้งสังเคราะห์

ยีสต์ที่คัดเลือกได้ได้แก่ รหัส CTWY02, CTWY11 และ CTWY29 ที่มีการผลิตวงใสสูงสุด 3 อันดับแรก เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไลเปสในน้ำทิ้งสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและน้ำหนักแห้ง (Fig. 3)

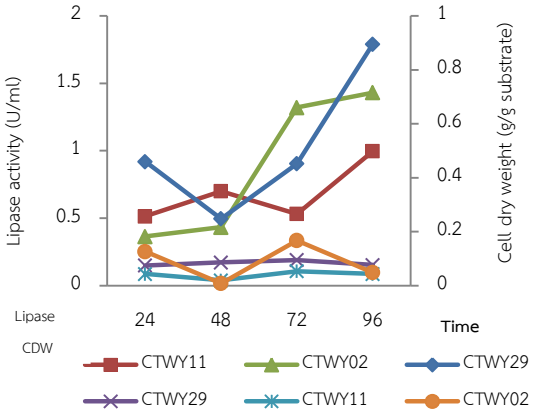

Fig. 3 Lipase activity and cell dry weight of selected yeasts in synthetic waste water

จากผลการทดลอง Fig. 3 ความสามารถในการสร้างกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในน้ำทิ้งสังเคราะห์ พบว่าเชื้อรหัส CTWY29 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสร้างกิจกรรมไลเปส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.43 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ชั่วโมงที่ 96) รองลงมาคือ CTWY11 และ CTWY02 เท่ากับ 0.99 และ 0.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ชั่วโมงที่ 96) ตามลำดับเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์และน้ำหนักแห้งพบว่าสอดคล้องกัน โดยเชื้อรหัส CTW29 มีน้ำหนักแห้งมากที่สุดเท่ากับ 0.16 (ชั่วโมงที่ 72) รองลงมา คือ CTW02 เท่ากับ 0.09 (ชั่วโมงที่ 72) และ CTW11 เท่ากับ 0.05 (ชั่วโมงที่ 72)

2) ผลการวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปสและน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ในน้ำทิ้งจริง

จากการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นทุติยภูมิ ได้เชื้อยีสต์รหัส CTWY29, CTWY11 และ CTWY02 ที่มีการผลิตวงใสสูงสุด 3 อันดับแรก มาวิเคราะห์กิจกรรมไลเปสในโดยหมักเชื้อในน้ำเสียจริงผลการทดลองดังแสดงใน Fig. 4

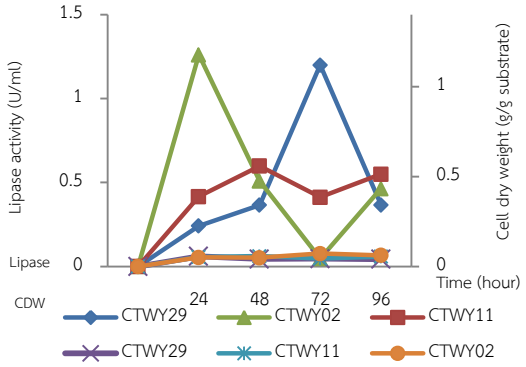

Fig. 4 Lipase activity and cell dry weight of selected yeasts in canteen waste water

จากผลการทดลองใน Fig. 4 ความสามารถในการสร้างกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในน้ำทิ้งจริง พบว่าเชื้อรหัส CTWY29 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสร้างกิจกรรมไลเปส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ชั่วโมงที่ 24) รองลงมาคือ CTWY02 และ CTWY11 เท่ากับ 1.20 และ 0.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ชั่วโมงที่ 72 และ 48) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์และน้ำหนักแห้งพบว่าสอดคล้องโดยเชื้อรหัส CTW29 มีค่าน้ำหนักแห้งมากที่สุด เท่ากับ 0.07 (ชั่วโมงที่ 72) รองลงมาคือ CTW02 เท่ากับ 0.05 (ชั่วโมงที่ 24) และ CTW11 เท่ากับ 0.05 (ชั่วโมงที่ 48)

1.4 ผลการวิเคราะห์ไขมันที่เหลือและประสิทธิภาพการย่อยไขมันในน้ำทิ้ง

ในการย่อยไขมันในน้ำทิ้งจริง โดยยีสต์รหัส CTWY02, CTWY11 และ CTWY29 ในชั่วโมงที่ 96 วิเคราะห์ปริมาณไขมันที่เหลือตามวิธีของ APHA, AWWA, WEF, (2012) ผลแสดงใน Table 2

Table 2 Lipid content and lipid efficiency of digestion of waste water

Isolate	Lipid content (mg/L)	Lipid efficiency of digestion (%)
CTWY 02	14.54	23.63
CTWY 11	10.31	45.85
CTWY 29	5.20	72.69

ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยไขมันในน้ำทิ้งจริง (โรงอาหารของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม) ซึ่งมีปริมาณไขมันเท่ากับ 19.04 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 2) พบว่า รหัส CTWY29 มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันสูงที่สุด 72.69% (ปริมาณไขมันที่เหลือเท่ากับ 5.20 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาได้แก่ เชื้อรหัส CTWY11 และ CTWY02 ซึ่งมีปริมาณไขมันที่เหลือเท่ากับ 10.31 และ 14.54 ตามลำดับ จากผลการทดลองในข้อ ที่ 1.4 ให้ผลที่สอดคล้องกับปริมาณไขมันที่เหลือเนื่องจากพบว่า เชื้อรหัส CTWY29 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ซึ่งทำให้สามารถย่อยไขมันในน้ำทิ้งอย่างมีประสิทธิภาพ (72.69%) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา และในปัจจุบันในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มีการนำยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมาใช้กันอย่างกว้างขวางไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร สารซักฟอก ยารักษาโรค เครื่องสำอาง สิ่งทอ ฯลฯ เนื่องจากยีสต์เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้ง่ายและเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสที่ยีสต์ผลิตได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูง (Nuilert, 2013) โดยในการย่อยไขมัน (ไตรกลีเซอไรด์) จะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยา

1.5 ผลการผลิตไบโอดีเซล

ในทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เซลล์ยีสต์รหัสเชื้อ CTWY02, CTWY11 และ CTWY29 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ ผลการทดลองแสดงใน Fig. 5

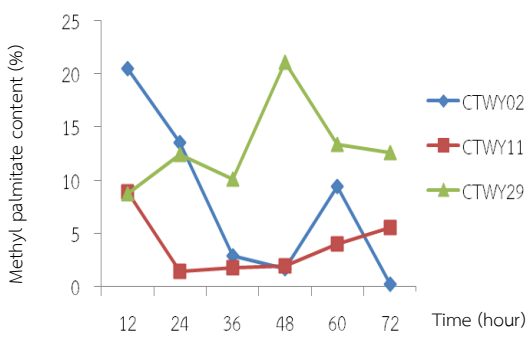

Fig. 5 Methyl palmitate content of CTWY02, CTWY11 andCTWY29

จากผลการทดลองใน Fig. 5 แสดงปริมาณเมทิลปาล์มมิเตท (Methyl palmitate) พบว่า เชื้อรหัส CTWY29 มีปริมาณเมทิลปาล์มมิเตทสูงที่สุดเท่ากับ 21.07% (ชั่วโมงที่ 48) รองลงมาคือ CTWY02 และ CTWY11 เท่ากับ 20.46 % และ 8.19 % (ชั่วโมงที่12) ตามลำดับ

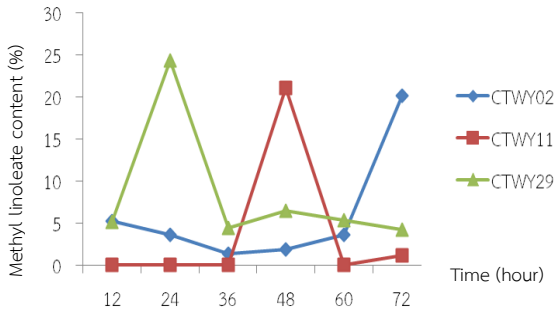

Fig. 6 Methyl linoleate content of CTWY02, CTWY11 and CTWY29

จากผลการทดลองใน Fig. 6 แสดงปริมาณเมทิลลิโนเลเอทพบว่า เชื้อรหัส CTWY29 มีปริมาณเมทิลลิโนเลเอทสูงที่สุดเท่ากับ 24.28% (ชั่วโมงที่ 24) รองลงมา คือ CTWY11 และ CTWY02 เท่ากับ 21.05% และ 20.11% (ชั่วโมงที่ 48 และ 72) ตามลำดับ

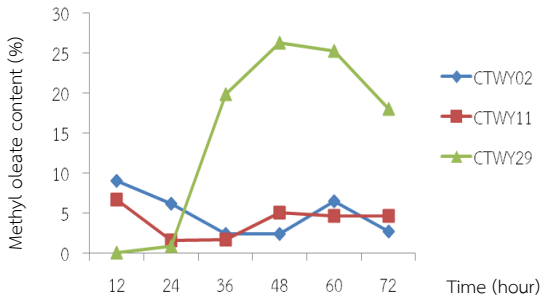

Fig. 7 Methyl oleate content of CTWY02, CTWY11 and CTWY29

จากผลการทดลองใน Fig. 7 แสดงปริมาณเมทิลโอเลเอทพบว่า เชื้อรหัส CTWY29 มีปริมาณเมทิลโอเลเอตสูงที่สุดเท่ากับ 26.05% (ชั่วโมงที่ 48) รองลงมาคือ CTWY02

และ CTWY11 เท่ากับ 9.30% และ 6.67% (ชั่วโมงที่12) ตามลำดับ

2. วิจารณ์ผลการวิจัย

การสร้างเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ที่คัดเลือกจากผลการทดลองพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดวัดได้ระหว่างที่ยีสต์มีการเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase เนื่องจากพบว่าระยะนี้เป็นระยะหลังจากที่เชื้อมีการใช้สารอาหารอย่างเต็มที่เพื่อเกิดการเจริญสูงสุด และเริ่มมีการผลิตสารเมแทบอไลซ์ปฐมภูมิซึ่งเป็นสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของยีสต์ ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ได้แก่ กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ แอลกอฮอล์ แอซีโตนบิวทานอล และพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นต้น รวมทั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งเกิดได้ดีในระยะนี้ โดยที่ชีวมวลเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ (อัตราการเกิดและอัตราการตายสมดุลกัน) ซึ่งปริมาณการผลิตของสารประเภทนี้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเติบโตของจุลินทรีย์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำทิ้งสังเคราะห์มีค่าสูงกว่าน้ำทิ้งจริง เนื่องจากในน้ำทิ้งสังเคราะห์มีการควบคุมแหล่งของไขมันเพียงชนิดเดียวคือ น้ำมันปาล์มและแหล่งของสารอื่น ๆ ที่ส่งเสริมการเจริญของยีสต์ ในขณะที่น้ำทิ้งจริงมีแหล่งของไขมันที่หลากหลาย เช่น น้ำมันปาล์มหรือน้ำมันถั่วเหลือง รวมถึงสารอื่น ๆ สารประกอบของเกลือโซเดียม หรือ Cocamido propyl betaine (CAPB) ในน้ำยาล้างจานและโปรตีนซึ่งมีผลต่อการย่อยไขมันและการเจริญของยีสต์ จากรายงานการวิจัยของ Nonthirach and Puengratsamee (2011) บำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียด้วยกระบวนการทางชีววิทยาโดยอาศัยจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ ได้แก่ *Candida maltose*, *C. tropicalis* และ *Yarrowia lipolytica* พบประสิทธิภาพในการบำบัดไขมันและน้ำมันเท่ากับ 53, 51 และ 82% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Y. lipolytica* เป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย และ Supachatturat *et al.* (2007) คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและโรงงานน้ำมันพืช สามารถแยกเชื้อยีสต์ 5 ไอโซเลต และแบคทีเรีย 1 ไอโซเลต การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและประสิทธิภาพในการกำจัดไขมัน พบว่า ยีสต์ไอโซเลต SSB-12 มีความสามารถของการผลิตเอนไซม์ไลเปสและประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันมากที่สุด เท่ากับ 98.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 85.76% ตามลำดับ

จากการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทั้ง 3 สายพันธุ์ พบเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ เมทิลปาล์มมิเตท เมทิลลิโนเลเอท และเมทิลโอเลเอท (Fig. 5, 6 และ 7) ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชที่ต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันพืชเป็นสารประกอบไตรกลีเซอไรด์ ที่มีกรดไขมันอยู่ในโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ถึง 94-96% ของน้ำหนักโมเลกุล ทำให้คุณสมบัติของน้ำมันมีคุณสมบัติทั้งทางเคมีและกายภาพเป็นไปตามกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ ดังนั้นเมื่อนำน้ำมันพืชชนิดนั้น ๆ มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตได้จะมีสัดส่วนของชนิดเมทิลเอสเทอร์ตามชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบนั้นๆ จากรายงานของ Hongpattarakeeree and Chiensin (2005) พบว่า กรดไขมันปาล์มมิติก และโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันปาล์ม คือ มีอยู่ถึง 36.50 และ 43.68% ตามลำดับ ดังนั้นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจึงเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันปาล์มมิติกและโอเลอิกเป็นส่วนใหญ่

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำทิ้งโรงอาหารพบเชื้อยีสต์รหัส CTWY29 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 1.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันเท่ากับ 72.69% ที่เวลา 96 ชั่วโมง การผลิตไบโอ-ดีเซลจากยีสต์ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส ตรวจพบไบโอดีเซล (ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล) ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เมทิลปาล์มมิเตท เมทิลลิโนเลเอท และเมทิลโอเลเอท โดยเชื้อยีสต์รหัส CTWY29 ให้ปริมาณของไบโอดีเซลชนิดเมทิลโอเลเอทสูงสุดเท่ากับ 26.25% (ชั่วโมงที่ 48) แสดงให้เห็นว่า สามารถนำเซลล์ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสมาประยุกต์ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลได้ปัจจุบันนักวิจัยมุ่งความสนใจสู่การค้นคว้าวิจัยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพซึ่งมีข้อดีเหนือตัวเร่ง

ปฏิกิริยาทางเคมีหลายประการ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (Biocatalyst) เช่น ไลเปส เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยเฉพาะจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา และยีสต์ การผลิตไบโอดีเซลโดยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพนับเป็นกระบวนการใหม่ที่สนใจอย่างยิ่ง วิธีการนี้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมไม่ต้องใช้พลังงานมากมาย เนื่องจากเกิดขึ้นในสภาวะอุณหภูมิปกติทั่วไป ส่วนกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำมันไม่สร้างปัญหาใด ๆ ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลกลีเซอรีนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเกิดขึ้นจะอยู่ในรูปเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ จึงสามารถแยกออกมาจากไบโอดีเซลได้ง่ายและสามารถใช้ประโยชน์ต่อไปโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งแตกต่างจากกระบวนการผลิตโดยการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยนักศึกษาระดับอุดมศึกษา สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน ประจำปีงบประมาณ 2557 ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนทุนสำหรับการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

References

APHA, AWWA, WEF. 2012. Standard methods for examination of water and wastewater. 22nd edition: American Public Health Association. . Washington. pp.1360.

Chigusa, S., Hasegawa, T., Yamamoto, N. and Watanabe, Y. 1996 Treatment of waste water from oil manufacturing plant by yeasts. Wat. Sci. Tech. 34(11): 51-58.

Hongpattarakeeree, T. and Chiensin, B. 2005. Selection of lipase producing yeast and applied for biodiesel from palm oils. Projecit under Songklanakarin University. (in Thai)

Jitpirom, K. and Sangaroon, P. 2012. Detection of lipolytic bacteria from environment samples. J. Public Health. 47(2). 3-18. (in Thai)

Nonthirach, A. and Puengratsamee, V. 2011. Waste water treatment with fat composition and lipid by yeasts. Journal of environmental management. 7(2): 1-9. (in Thai)

Nuilert, M. 2013. Lipase production by *Rhodotorula mucilagenosa* and cell for biodiesel production by palm oils. Department of Biotechnology, Songklanakarin University: Songkla. pp. 39-72. (in Thai)

Peppler, H.J. and Perlmem, D. 1976. Fermentation technology. In: Microbial Technology. 2nd edition. Academic Press: Massachusetts. pp. 211–222.

Rekha, C., Poornima, G., Manasa, M., Abhipsa, V., Devi, P.J., Kumar, V.H.T. and Kekuda, T.R.P. 2012. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. Chem. Sci. Trans. 1(2): 303-310.

Samniang, A., Tipachan, C. and Kajorncheappun-ngam, S. 2014. Comparison of biodiesel production from crude Jatropha oil and Krating oil by supercritical methanol transesterification. Renewable Energy. 68. 351-355. (in Thai)

Sombatsomphop, K., Prakansamut, A. and Wittayawiroj, N. 2011. Comparative studies on microorganism efficiency for canteen wastewater treatment in King Mongkut's University of Technology North Bangkok. The Journal of KMUTNB. 21(1): 72-79. (In Thai)

Supachatturat, S., Kanlayakrit, W., Vanichsriratana, W. and Bhuwapathanapun, S. 2007. Screening of high lipase producing microorganismsfrom sludge of food industry, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural industry, Kasetsart University: Bangkok. pp. 712-718. (in Thai)

Thabet, H.M., Pasha, C., Ahmed, Md.M. and Linga, V.R. 2012. Isolation of novel lipase producing *Sporobolomyces salmonicolor* OVS8 from oil mill spillage and enhancement of lipase production. Jordan J. Biol. Sci. 5(4): 301-306.

Vasudevan, P.T. and Briggs, M. 2008. Biodiesel production current state of the art and challenges. J. Ind. Microbiol. Biotech. 35: 421-430.

Wattanaying, P., Mingratakul, S. and Akkarapol, S. n.d. Comparison of efficiency on lipid and fat removal in waste water by microorganism. Project of Bodindecha School (Sing Singhasenee), Nonthaburi. (in Thai)