

FINAL RESEARCH REPORT

**OIL PRODUCTION FROM OLEAGINOUS YEAST USING RAW GLYCEROL
FROM BIODIESEL PLANT AND ITS POTENTIAL USE FOR
BIODIESEL PRODUCTION**

BY

ASSOC. PROF. DR. BENJAMAS CHEIRSILP

ASSIST. PROF. DR. THANWADEE TACHAPATTAWEA WRAKUL SUKSAROGE

CHANIKA SAENGE

**FACULTY OF AGRO-INDUSTRY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาศักยภาพของยีสต์ไขมันสูง *Rhodotorula glutinis* เพื่อใช้ในการแปรรูปของเสียทางชีวภาพ ได้แก่ น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและกลีเซอรอลดิบ เพื่อผลิตน้ำมันในรูปของลิปิดและแคโรทีนอยด์ที่มีมูลค่า โดย *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 เป็นยีสต์ที่สามารถสะสมได้ทั้งลิปิดและแคโรทีนอยด์ จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล พบว่าการเติม แอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน และ Tween 20 เพื่อเป็นตัวกระตุ้นทำให้เชื้อมีการเติบโตเพิ่มขึ้น และสามารถผลิตลิปิดและแคโรทีนอยด์ได้มากขึ้น และยังช่วยส่งเสริมการลดซีโอดีในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและการใช้กลีเซอรอล จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง Response Surface Methodology (RSM) เมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกำหนดตัวแปรที่ศึกษา คือ ซีโอดี อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และความเข้มข้นของ Tween 20 และกำหนดค่าการตอบสนอง คือ ปริมาณเซลล์ ปริมาณลิปิด และ ปริมาณแคโรทีนอยด์ พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเซลล์ ลิปิด และแคโรทีนอยด์ อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 140 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์ ในขณะที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 180 และ 170 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตลิปิดและแคโรทีนอยด์ ตามลำดับ แสดงว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำหรือปริมาณไนโตรเจนที่สูงนั้นสามารถเพิ่มการผลิตเซลล์แต่ให้การผลิตลิปิดและแคโรทีนอยด์น้อย ดังนั้นจึงต้องศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบบสองขั้นตอนโดยในขั้นตอนแรกสำหรับการเติบโตและขั้นที่สองสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ จากผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงแบบสองขั้นตอนสามารถผลิตลิปิดและแคโรทีนอยด์ได้เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงแบบขั้นตอนเดียวร้อยละ 50 และร้อยละ 20 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชที่ 6.0 และให้อากาศที่ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ทำให้การผลิตลิปิดและแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น และจากการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง พบว่าเชื้อสามารถสะสมลิปิดและแคโรทีนอยด์ในปริมาณสูงได้เป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าซีโอดีในน้ำทิ้งได้ดีอีกด้วย

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* TISTR 5159 โดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นสับสเตรท ผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ ลิปิด และแคโรทีนอยด์ อย่างมีนัยสำคัญและปัจจัยร่วมที่มีผลต่อการผลิตลิปิดคือ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนร่วมกับความเข้มข้นของกลีเซอรอล และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนร่วมกับความเข้มข้นของ Tween 20 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์จากพื้นผิวการตอบสนองโดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ Tween 20

คงที่ที่ 1.5 กรัมต่อลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณเซลล์คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 8.5 และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60 ในขณะที่สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิปิดและแคโรทีนอยด์คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 9.5 และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 85 เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชที่ 6.0 และให้อากาศที่ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาทีทำให้ปริมาณลิปิดและแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น และจากการเลี้ยงแบบกึ่งกะที่ควบคุมให้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลคงที่พบว่าสามารถผลิตลิปิดได้ 6.05 กรัมต่อลิตร และผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 135.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในการผลิตไบโอดีเซลจากลิปิดจากยีสต์ทำการผลิตแบบสองขั้นตอน โดยทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทานอลโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วตามด้วยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทานอลโดยใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าไบโอดีเซลที่ได้นั้นมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันโอเลอิกและกรดไขมันปาล์มเมติก ซึ่งคล้ายกับไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชและมีสมบัติใกล้เคียงกับมาตรฐานไบโอดีเซล

การศึกษาการขยายขนาดเป็นการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ขนาด 15 ลิตร ปริมาตรอาหาร 10 ลิตร โดยใช้น้ำทั้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท พบว่าสามารถผลิตลิปิดและแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดที่ 7.64 กรัมต่อลิตร และ 189.32 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การใช้กลีเซอรอลดิบเป็นสับสเตรท พบว่าผลิตลิปิดและแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดที่ 6.76 กรัมต่อลิตร และ 162.31 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เนื่องจากการเลี้ยง *R. glutinis* TISTR 5159 สามารถประยุกต์เลี้ยงในระบบบำบัดน้ำเสียได้ ทำให้สามารถลดต้นทุนในส่วนของถังหมักและค่าไฟฟ้าในการเลี้ยงเชื้อได้ จากการศึกษาความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ พบว่าต้นทุนสารเคมีสำหรับการผลิตลิปิดจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มคือ 0.036 บาทต่อกิโลกรัม และต้นทุนสารเคมีสำหรับการผลิตลิปิดจากกลีเซอรอลดิบคือ 8.5 บาทต่อกิโลกรัม เมื่อรวมค่าไฟฟ้าสำหรับการสกัดน้ำมัน (2.50 บาทต่อกิโลวัตต์ชั่วโมง) 0.006 บาทต่อกิโลกรัม ทำให้ต้นทุนรวมในการผลิตลิปิดจากน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและกลีเซอรอลดิบคือ 0.042 บาทต่อกิโลกรัม และ 8.566 บาทต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ABSTRACT

This study has shown the potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for bioconversion of wastes including palm oil mill effluent (POME) and crude glycerol to value-added oil in lipid form and carotenoids. An oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 that accumulates both lipids and carotenoids was cultured in POME and crude glycerol. The addition of ammonium sulfate and Tween 20 improved biomass, lipids and carotenoids production as well as the removal of chemical oxygen demand (COD) in POME and glycerol consumption.

Response surface methodology (RSM) was applied to optimize the medium composition for bioconversion of POME including COD in POME, C/N ratio and Tween 20 concentration. Among three investigated factors, C/N ratio contributed a significant effect on lipids and carotenoids production. The analysis of response surface plots revealed that the optimum C/N ratio for biomass was 140, while that for lipid content and carotenoids were higher at 180 and 170, respectively. The high level of nitrogen source (with a low C/N ratio) enhanced the biomass, making the accumulation of lipids and carotenoids less preferable. Hence, the two-stage process was attempted as an optimal way for cell growth in the first stage and product accumulation in the second stage. The lipid yield and carotenoid production obtained in the two-stage process were increased 50% and 20%, respectively, from those obtained from the one-stage process. The production of lipid and carotenoids were further improved in a stirred tank bioreactor with pH controlled at 6.0 and aeration rate at 2 vvm. In the semi-continuous fermentation, *R. glutinis* TISTR 5159 was found successfully accumulated a high lipid content and produced considerable high concentration of carotenoids during long-term cultivation. Moreover, efficient COD removal by *R. glutinis* TISTR 5159 was also observed.

Crude glycerol, a by-product of biodiesel plants, was used as the sole carbon source for *R. glutinis* TISTR 5159. Among the factors investigated using response surface methodology, the C/N ratio contributed a significant effect on biomass, lipid content and production of carotenoids. The synergic effects of the C/N ratio and glycerol concentration as well as the C/N ratio and Tween 20 concentration

were observed in the accumulation of lipids. The analysis of the response surface plots revealed that when Tween 20 was fixed at maximum level of 1.5 g/L the optimum condition for biomass was glycerol concentration of 8.5% and C/N ratio of 60, while that for lipid content and carotenoids production was glycerol concentration of 9.5% and C/N ratio of 85. The production of lipids and carotenoids were further improved in a stirred tank bioreactor with pH controlled at 6.0 and aeration rate at 2 vvm. In fed-batch fermentation, the highest lipid production of 6.05 g/L with a cellular lipid content of 60.7 % and carotenoids production of 135.25 mg/L were obtained when the glycerol concentration was maintained at the optimum level throughout the fermentation process.

The production of biodiesel from yeast lipids was carried out in two steps. After hydrolysis reaction, esterification with methanol was carried out using acid catalysis. The biodiesel derived from yeast lipids was mainly composed of oleic and palmitic acids, which were similar to those from plants oil, and it also showed the favorable biodiesel properties.

The scale up of lipids production from POME and crude glycerol in 15 L-bioreactor with working volume of 10 L was performed. The maximum lipids yield and carotenoids concentration obtained from POME were 7.64 g/L and 189.32 mg/L, respectively. While the use of crude glycerol provided lower lipids yield and carotenoids concentration of 6.76 g/L and 162.31 mg/L, respectively.

Since the cultivation of *R. glutinis* TISTR 5159 could be applied in conventional wastewater treatment, the costs for bioreactor and electricity for cultivation could be reduced. The study of economic feasibility found that the costs of chemical for lipids production were 0.036 baht/kg from POME and 8.5 baht/kg from crude glycerol. The costs of electricity for oil recovery (based on 2.50 baht/kw.h) were 0.006 baht/kg. Hence, the sum of costs for lipids production by *R. glutinis* TISTR 5159 cultivated in POME and crude glycerol were 0.042 baht/kg and 8.566 baht/kg, respectively.