หัวข้อดุษฎีนิพนธ์	การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของกลีเซอรอลดิบที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลให้เป็นลิพิดและแคโรทีนอยด์โดยใช้ยีสต์โอลิจีนัส	
ผู้เขียน	นางสาวอัจฉรา มะโนวัฒนา	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนงศักดิ์ ไชยาโส	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฐ ศรีสุริยจันทร์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ หาญเมืองใจ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร.รัชพล พะวงศ์รัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

กลีเซอรอลดิบเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จัดเป็นสารตั้งต้นที่มีศักยภาพสูงสำหรับการเปลี่ยนแปลงเชิงชีวภาพให้เป็นสารเคมีมูลค่าสูงโดยอาศัยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ ในมุมมองของการใช้ของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพสูงสุด พบว่า ยีสต์โอลิจีนัสสีแดง *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 (ชื่อเดิม *Sporobolomyces pararoseus* TISTR5213) มีศักยภาพสูงในการเปลี่ยนแปลงเชิงชีวภาพของกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารเคมีมูลค่าสูง ได้แก่ ลิพิดจากจุลินทรีย์และแคโรทีนอยด์ ยีสต์โอลิจีนัสสีแดงสายพันธุ์นี้สามารถผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง ลิพิด เบต้า-แคโรทีน และแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ได้ถึง 9.40±0.12 กรัมต่อลิตร 2.92±0.03 กรัมต่อลิตร 25.76±0.85 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 33.67±1.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณเมทานอลที่เจือปนอยู่ในกลีเซอรอลดิบนั้นไม่มีต่อผลปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการกำจัดเมทานอลแล้ว อย่างไรก็ตาม กลีเซอรอลดิบที่กำจัดเมทานอลแล้วช่วยส่งเสริมการผลิตเบต้า-แคโรทีน (15.76±0.85 มิลลิกรัมต่อลิตร) แคโรทีนอยด์ทั้งหมด (33.67±1.28 มิลลิกรัมต่อลิตร) และลิพิด (2.92±0.03 กรัมต่อลิตร) ได้อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาผลร่วมกันระหว่างความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบที่กำจัดเมทานอลแล้ว (55.04 กรัมต่อลิตร) กับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในการผลิต (พีเอช 5.63) และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (24.01 องศาเซลเซียส) โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (central composite design, CCD) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง ลิพิด เบต้า-แคโรทีน และแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเป็น 8.83±0.05 กรัมต่อลิตร 4.00±0.06 กรัมต่อลิตร 27.41±0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 53.70±0.48 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้การเติมน้ำมันมะกอก (5.0─20.0 กรัมต่อลิตร) ลงในอาหารสูตรที่เหมาะสมสามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (14.96±0.19 กรัมต่อลิตร) ลิพิด (6.40±0.09 กรัมต่อลิตร) เบต้า-แคโรทีน (54.43±0.95 มิลลิกรัมต่อลิตร) และแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (70.93±0.51 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้ดียิ่งขึ้น

การศึกษาการขยายขนาดการผลิตของน้ำหนักเซลล์แห้ง ลิพิด เบต้า-แคโรทีน และแคโรทีนอยด์ทั้งหมดโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ KM281507 ในถังหมัก 2 ชนิด คือ ถังหมักแบบใบกวนและถังหมักแบบอากาศยก พบว่าการเปลี่ยนแปลงเชิงชีวภาพของกลีเซอรอลดิบที่กำจัดเมทานอลแล้วมีความสามารถสูง เมื่อดำเนินการในถังหมักแบบอากาศยกขนาด 3.0 ลิตร ภายใต้สภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอช (พีเอชเริ่มต้น 5.63) ผลิตปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ลิพิด เบต้า-แคโรทีน และแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ 10.62±0.21 กรัมต่อลิตร 3.26±0.13 กรัมต่อลิตร 30.64±0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 46.59±0.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้การให้อากาศที่ระดับ 6.0 vvm ร่วมกับการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolved oxygen, DO) ให้คงที่ ที่ระดับ 60±5 เปอร์เซ็นต์ โดยการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์ลงในถังหมักร่วมกับการให้แสงสว่างที่ 10,000 ลักซ์ เป็นสภาวะที่ช่วยส่งเสริมการผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง ลิพิด เบต้า-แคโรทีน และแคโรทีนอยด์ทั้งหมด โดยเพิ่มขึ้นเป็น 19.30±1.07 กรัมต่อลิตร 6.61±0.04 กรัมต่อลิตร 109.75±0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 151.00±2.71 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการเจริญจำเพาะเป็น 0.16±0.00 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตลิพิด เบต้า-แคโรทีน และแคโรทีนอยด์ทั้งหมด คือ 0.94±0.04 กรัมต่อลิตรต่อวัน 15.68±0.40 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และ 21.56±0.20 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ลิพิดที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ KM281507 ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูง โดยมีกรดโอเลอิก (C18:1) เป็นองค์ประกอบหลักถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด

การศึกษาการปรับปรุงการผลิตแคโรทีนอยด์และลิพิดของยีสต์สายพันธุ์ KM281507 โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต หรือ ethyl methane sulfonate (EMS) หรือ 5-bromouracil (5BU) อย่างใดอย่างหนึ่ง พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ไอโซเลต B151 ที่ได้จากการใช้ 5BU มีสีของโคโลนีที่แดงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้ยังสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ 74.01±0.17 มิลลิกรัมต่อลิตร และลิพิด 5.28±0.06 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอยู่ 54.28 และ 27.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้เพียง 47.97±0.26 มิลลิกรัมต่อลิตร และลิพิดได้เพียง 4.13±0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมที่มีกลีเซอรอลดิบที่กำจัดเมทานอลแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองนี้แสดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ 5BU นั้นมีศักยภาพสูงในการปรับปรุงการผลิตแคโรทีนอยด์และลิพิดโดย *Sporidiobolus pararoseus* KM281507

จากผลของการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า ยีสต์โอลิจีนัสสีแดง *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงสำหรับการเปลี่ยนแปลงเชิงชีวภาพของกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารเคมีมูลค่าสูงได้แก่ ลิพิด เบต้า-แคโรทีน และแคโรทีนอยด์ ซึ่งนับได้ว่าเป็นการใช้แหล่งทรัพยากรทดแทนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 ยังจัดเป็นแหล่งของแคโรทีนอยด์ตามธรรมชาติ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสีผสมอาหารหรือนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Dissertation Title	Bioconversion of Biodiesel-derived Crude Glycerol to Lipids and Carotenoids by Oleaginous Yeasts	
Author	Miss Atchara Manowattana	
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Thanongsak Chaiyaso	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Phisit Seesuriyachan	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Prasert Hanmoungjai	Co-advisor
	Dr. Ratchapol Pawongrat	Co-advisor

Abstract

Crude glycerol is a byproduct obtained from biodiesel production process. It is a high potential substrate for bioconversion into the high value chemicals by microbial fermentation. In the point of view of efficiency industrial wastes utilization, an oleaginous red yeast, *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 (formery name; *Sporobolomyces pararoseus* TISTR5213) had a great potential for bioconversion of crude glycerol to high valuable chemicals of microbial lipids and carotenoids. This oleaginous red yeast could produce a maximum dry cell weight (DCW), lipids, β-carotene and total carotenoids up to 9.40±0.12 g/L, 2.92±0.03 g/L, 25.76±0.85 mg/L and 33.67±1.28 mg/L, respectively, when cultivated in the basal medium supplemented with crude glycerol as a carbon source. The methanol content in crude glycerol did not show significantly effect on DCW compared to demethanolized crude glycerol. However, demethanolized crude glycerol significantly supported the production of β-carotene (15.76±0.85 mg/L), total carotenoids (33.67±1.28 mg/L) and lipids (2.92±0.03 g/L). The combination effect of this crude glycerol concentration (55.04 g/L), initial pH of production medium (pH 5.63) and cultivation temperature (24.01°C) for 5 days of cultivation periods using a central composite design (CCD), could elevate the production of DCW, lipids, β-carotene and total carotenoids production up to 8.83±0.05 g/L, 4.00±0.06 g/L, 27.41±0.20 mg/L and 53.70±0.48 mg/L, respectively. Moreover,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

addition of olive oil (5.0–20.0 g/L) into the optimal production medium could dramatically increase the production of DCW (14.47±0.15 g/L), lipids (6.40±0.09 g/L), β-carotene (54.43±0.95 mg/L) and total carotenoids (70.92±0.51 mg/L).

The scale up production of DCW, lipids, β-carotene and total carotenoids by strain KM281507 was also investigated in both of stirred-tank and airlift bioreactors. The high bioconversion ability of demethanolized crude glycerol was observed in 3.0 L airlift bioreactor under uncontrolled pH regimes (initial pH 5.63). The production of DCW, lipids, β-carotene and total carotenoids were 10.62±0.21 g/L, 3.26±0.13 g/L, 30.64±0.05 mg/L and 46.59±0.07 mg/L, respectively. Furthermore, the aeration rate of 6.0 vvm with a constant dissolved oxygen (DO) level of 60±5% maintained by flushing pure oxygen (O_2) into the vessel, combined with light irradiation at 10,000 Lux were the promising condition to support the production of DCW, lipids, β-carotene and total carotenoids, which were reached to 19.30±1.07 g/L, 6.61±0.04 g/L, 109.75±0.21 mg/L and 151.00±2.71 mg/L, respectively. Meanwhile, the specific growth rate (μ) of 0.16±0.00 1/h, lipids, β-carotene and total carotenoids productivities of 0.94±0.04 g/L/d, 15.68±0.40 mg/L/d and 21.56±0.20 mg/L/d, respectively, were achieved. Lipids from strain KM281507 contained very high content of unsaturated fatty acid by a prevalent of oleic acid (C18:1) with 80% of total fatty acid.

Improvement of carotenoids and lipids production of strain KM281507 was studied by random mutagenesis using either ultraviolet (UV) or ethyl methane sulfonate (EMS) or 5-bromouracil (5BU). The mutant isolate B151 obtained from by 5BU mutagenesis showed a higher intensity of red color than the wild-type. Moreover, it produced 74.01±0.17 mg/L of total carotenoids, and 5.28±0.06 g/L of total lipids, which were 54.28% and 27.28% higher, respectively, than the wild-type. While, the wild-type produced only 47.97±0.26 mg/L of total carotenoids and 4.13±0.01 g/L of total lipids when cultured in the optimal medium supplemented with demethanolized crude glycerol as the sole carbon source. These results indicate that 5BU-mutagenesis has a high potential to improve carotenoids and lipids production by *Sporidiobolus pararoseus* KM281507.

From the results of this study, it could be concluded that oleaginous red yeast, *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 is a great potential microorganism for bioconversion

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

of crude glycerol into high value added chemicals including lipids, β-carotene and carotenoids according to the view of efficient renewable resource utilization. Moreover, *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 also provides a natural of carotenoids source which will be further used as food colorant or other applications.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved