

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตลิพิดและแคโรทีนอยด์จากโอลิจินัสซิสต์โดยใช้เศษข้าวที่ได้จากขยะอาหารเป็นแหล่งคาร์บอน
ผู้เขียน	นางสาววิมาดา ศรีสุวรรณ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทงศักดิ์ ไชยาโส อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชรินทร์ เตชะพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เศษข้าวที่ได้จากขยะอาหารประกอบด้วยสตาร์ชเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสามารถย่อยให้เป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ หรือใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยตรงสำหรับการเจริญและการผลิตสารเมแทบอไลต์มูลค่าสูงโดยจุลินทรีย์หลายชนิด ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้เศษข้าวและไฮโดรไลเสทจากเศษข้าวที่ได้จากขยะอาหารเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตมวลเซลล์ลิพิด และแคโรทีนอยด์โดยยีสต์โอลิจินัสซิสต์แดง เศษข้าวได้มาจากโรงอาหารคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประกอบด้วยปริมาณความชื้น ($7.18 \pm 0.34\%$) ปริมาณไขมัน ($0.75 \pm 0.01\%$) ปริมาณโปรตีน ($1.29 \pm 0.03\%$) ปริมาณเถ้า ($0.38 \pm 0.03\%$) และปริมาณคาร์โบไฮเดรต ($90.00 \pm 0.01\%$) ตามลำดับ เมื่อย่อยเศษข้าวด้วยเอนไซม์โดยใช้แอลฟา-อะไมเลส (180 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) และอะไมโลกลูโคซิเดส (120 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท) พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 168.02 ± 0.02 กรัมต่อลิตร

การศึกษาคัดเลือกยีสต์โอลิจินัสซิสต์แดงจากตัวอย่างดอกไม้และใบไม้ที่เก็บมาจากอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ และคลังจุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยและสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าสามารถคัดเลือกยีสต์ได้จำนวน 67 สายพันธุ์ และมีเพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้นที่จัดจำแนกเป็นยีสต์โอลิจินัสซิสต์แดง ซึ่งสามารถสะสมทั้งลิพิด ($>20\%$ โดยน้ำหนัก) และแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ เมื่อทำการจัดจำแนกยีสต์โอลิจินัสซิสต์แดงเหล่านี้โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ยีสต์เหล่านี้จัดจำแนกเป็น *Rhodotorula glutinis* KM281508, *Rhodospiridium* sp. KM281510, *Sporidiobolus pararoseus* KX709872 และ *Diozegia* sp.

TISTR5792 ตามลำดับ ยีสต์โอลิจินัสสีแดงเหล่านี้ผลิตลิพิดเชิงปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.61 ± 0.09 , 1.70 ± 0.09 , 1.04 ± 0.09 และ 0.98 ± 0.04 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณลิพิดต่อมวลเซลล์เท่ากับ 24.26 ± 0.56 , 23.69 ± 0.91 , 23.07 ± 0.80 และ $22.43 \pm 2.09\%$ (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ยีสต์เหล่านี้ยังสะสมแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ได้ โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.82 ± 0.05 , 1.57 ± 0.05 , 2.68 ± 0.09 และ 1.64 ± 0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีผลผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 150 ± 0.10 , 280 ± 0.22 , 595 ± 0.90 และ 400 ± 0.13 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยเศษข้าวด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน

Sporidiobolus pararoseus KX709872 สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีเศษข้าว (ไม่ผ่านการย่อย) เป็นแหล่งคาร์บอน สายพันธุ์ KX709872 ผลิตลิพิดเชิงปริมาณและมีปริมาณลิพิดต่อมวลเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.26 ± 0.01 กรัมต่อลิตร และ $21.67 \pm 0.02\%$ (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ในขณะที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเชิงปริมาณและผลผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 0.64 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 110.0 ± 0.00 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นสายพันธุ์ KX709872 ผลิตแอลฟา-อะไมเลส (540 ± 0.09 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร) และอะไมโลกลูโคซิเดส (23 ± 0.00 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร) และมีความสามารถสูงในการเปลี่ยนเศษข้าวที่ได้จากขยะอาหารเพื่อผลิตมวลเซลล์ลิพิด และแคโรทีนอยด์ได้โดยตรง

การศึกษาผลขององค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตมวลเซลล์ ลิพิด และแคโรทีนอยด์ของสายพันธุ์ KX709872 โดยใช้การออกแบบทางสถิติด้วยแผนการทดลอง Plackett-Burman design พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็นเพียงปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการผลิตมวลเซลล์ ลิพิด และแคโรทีนอยด์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 90% จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตมวลเซลล์ ลิพิด และแคโรทีนอยด์โดยใช้หลักการพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) แบบส่วนประสมกลาง (Central composite design, CCD) พบว่าที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25:1 ค่าพีเอช 5.44 อุณหภูมิ 25.34 องศาเซลเซียส และอัตราการกวน 192.73 รอบต่อนาที ได้ปริมาณมวลเซลล์ ปริมาณลิพิด ปริมาณลิพิดต่อมวลเซลล์ อัตราการผลิตลิพิด ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ปริมาณเบต้า-แคโรทีน ผลผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และผลผลิตเบต้า-แคโรทีนเท่ากับ 17.96 ± 0.07 กรัมต่อลิตร 8.99 ± 0.33 กรัมต่อลิตร $49.22 \pm 0.12\%$ (โดยน้ำหนัก) 1.67 ± 0.11 กรัมต่อลิตรต่อวัน 6.81 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร 2.71 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร 387 ± 14.11 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 154 ± 8.53 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

การศึกษาการผลิตลิพิดและแคโรทีนอยด์ในถังหมักแบบไบอิกวนขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมปริมาตร 2.5 ลิตร (อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 3.0 vvm

เป็นเวลา 7 วัน) ได้ปริมาณมวลเซลล์ ปริมาณลิพิด ปริมาณลิพิดต่อมวลเซลล์ และอัตราการผลิตลิพิด สูงสุดเท่ากับ 16.33 ± 0.49 กรัมต่อลิตร 8.75 ± 0.13 กรัมต่อลิตร $56.61 \pm 0.04\%$ (โดยน้ำหนัก) และ 2.19 ± 0.03 กรัมต่อลิตรต่อวัน ณ วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ปริมาณ เบต้า-แคโรทีน ผลผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และผลผลิตเบต้า-แคโรทีนสูงสุดเท่ากับ 7.10 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร 2.99 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร 600 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 252 ± 0.01 ไมโครกรัม ต่อกรัม ณ วันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณของกรดโอเลอิกเท่ากับ $62.13 \pm 0.04\%$ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ลิพิดจากสายพันธุ์ KX709872 มีศักยภาพสูงในการนำไป เป็นสารตั้งต้นรุ่นที่ 3 สำหรับการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากมีปริมาณของกรดโอเลอิกสูง นอกจากนี้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงกระบวนการผลิตลิพิดและแคโรทีนอยด์ของจุลินทรีย์แบบขึ้นตอนเดียว จากวัตถุดิบที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบโดยใช้อะไมโลไลติกยีสต์โอลิจินัสสีแดง ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่ายต่อการดำเนินการและต้นทุนต่ำ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Lipids and Carotenoids Productions from Oleaginous Yeasts Using Rice Residue from Food Waste as a Carbon Source		
Author	Miss Wimada Srisuwan		
Degree	Master of Science (Biotechnology)		
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Thanongsak Chaiyaso	Advisor	
	Asst. Prof. Dr. Charin Techapun	Co-advisor	

ABSTRACT

Rice residue from food waste composed of starch as a main component which can be either hydrolyzed to be fermentable sugars or directly used as a carbon source for growth and high value metabolite production by various types of microorganisms. Therefore, this study aimed to investigate the utilization of rice residue and rice residue hydrolysate from food waste as a carbon source for biomass, lipids and carotenoids productions by oleaginous red yeast. Rice residue was obtained from canteen of the Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University. It composed of moisture content ($7.18 \pm 0.34\%$), crude fat ($0.75 \pm 0.01\%$), crude protein ($1.29 \pm 0.03\%$), ash content ($0.38 \pm 0.03\%$) and carbohydrate content ($90.00 \pm 0.01\%$), respectively. Rice residue was subjected to enzymatic hydrolysis using α -amylase (180 U/g substrate) and amyloglucosidase (AMG) (120 U/g substrate), resulting in the maximal reducing sugar of 168.02 ± 0.02 g/L.

The screening of oleaginous red yeast from flowers and leaves samples collected from Doi-Inthanon National Park, the culture collection of the Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) and the Division of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University were studied. Sixty-seven isolates were obtained and only four isolates were identified as oleaginous red yeasts which could accumulate both of intracellular lipids ($>20\%$ w/w) and carotenoids. These oleaginous red yeasts were identified by a molecular genetics technique based on

nucleotide sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA. These yeasts were identified as *Rhodotorula glutinis* KM281508, *Rhodospiridium* sp. KM281510, *Sporidiobolus pararoseus* KX709872 and *Diozegia* sp. TISTR5792, respectively. These oleaginous red yeasts produced maximal volumetric production of lipids of 1.61 ± 0.09 , 1.70 ± 0.09 , 1.04 ± 0.09 and 0.98 ± 0.04 g/L, with lipids content of 24.26 ± 0.56 , 23.69 ± 0.91 , 23.07 ± 0.80 and 22.43 ± 1.09 % (w/w), respectively. These yeasts also accumulated carotenoids in their cells with volumetric production of total carotenoids of 0.82 ± 0.05 , 1.57 ± 0.05 , 2.68 ± 0.09 and 1.64 ± 0.35 mg/L and total carotenoids yield of 150 ± 0.10 , 280 ± 0.22 , 595 ± 0.90 and 400 ± 0.13 μ g/g, respectively, when cultivated in the basal medium supplemented with enzymatic-rice residue hydrolysate as a carbon source.

Sporidiobolus pararoseus KX709872 could grow well in the basal medium supplemented with rice residue (without hydrolysis) as a carbon source. Strain KX70982 produced the maximum volumetric production of lipids and lipids content of 1.26 ± 0.01 g/L and $21.67 \pm 0.02\%$ (w/w), respectively. While, the volumetric production of total carotenoids and total carotenoids yield were 0.64 ± 0.00 mg/L and 110.0 ± 0.00 μ g/g, respectively. Moreover, strain KX709872 produced α -amylase (540 ± 0.09 mU/mL) and AMG (23 ± 0.00 mU/mL), and showed high ability in directly converting rice residue from food waste for biomass, lipids and carotenoids productions.

The effects of medium composition on biomass, lipids and carotenoids productions of strain KX709872 were investigated using the Plackett-Burman design. Only one factor of the C:N ratio was significantly influenced on biomass, lipids and carotenoids productions at a confidence level above 90%. Optimal conditions for biomass, lipids and carotenoids production were further investigated using response surface methodology (RSM) via a central composite design (CCD). At a C:N ratio of 25:1, pH of 5.44, temperature of 25.34°C and agitation rate of 192.73 rpm, biomass, lipids, lipids content, lipids productivity, total carotenoids, β -carotene, total carotenoids yield and β -carotene yield reached 17.96 ± 0.07 g/L, 8.99 ± 0.33 g/L, $49.22 \pm 0.12\%$ (w/w), 1.67 ± 0.11 g/L/d, 6.81 ± 0.06 mg/L, 2.71 ± 0.08 mg/L, 387 ± 14.11 μ g/g and 154 ± 8.53 μ g/g, respectively.

The production of lipids and carotenoids was investigated in a 5-L stirred tank bioreactor containing 2.5-L of optimized medium (agitation rate, 300 rpm; aeration

rate, 3.0 vvm for 7 days). The maximum biomass, lipids, lipids content and lipids productivity were 16.33 ± 0.49 g/L, 8.75 ± 0.13 g/L, $56.61 \pm 0.04\%$ (w/w) and 2.19 ± 0.03 g/L/d achieved at day-4 of the cultivation period, with the maximum total carotenoids, β -carotene, total carotenoids yield and β -carotene yield of 7.10 ± 0.09 mg/L, 2.99 ± 0.06 mg/L, 600 ± 0.06 μ g/g and 252 ± 0.01 μ g/g achieved at day-6 of the cultivation period, respectively. Furthermore, oleic acid content of $62.13 \pm 0.04\%$ was achieved. This result indicated that lipids from strain KX709872 show high potential as the third feedstock for biodiesel production because of the high oleic acid content. Moreover, this study demonstrated a one-step production of microbial lipids and carotenoids from starchy material using amylolytic oleaginous red yeast, which is easy to operate and low-cost.