

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์โดยใช้กลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน
ผู้เขียน	นางสาวอัจฉรา มะโนวัฒนา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. ทนงศักดิ์ ไซยาโส

บทคัดย่อ

การนำกลีเซอรอลเหลือทิ้งที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับยีสต์สีแดงเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์นับได้ว่าเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งอย่างสูงสุด เนื่องจากกลีเซอรอลดังกล่าวไม่สามารถนำไปใช้ในอาหารหรือเครื่องสำอางได้ จากการคัดเลือกยีสต์สีแดงที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (วว.) จำนวน 14 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหารยีสต์-มอลต์สกัด อาหารสูตรพื้นฐานที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์หรือกลีเซอรอลเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์สีแดงจำนวน 11 สายพันธุ์สามารถเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในอาหารยีสต์-มอลต์สกัด แต่มีเพียง 9 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์หรือกลีเซอรอลเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอน

จากยีสต์สีแดงทั้ง 9 สายพันธุ์ดังกล่าว พบว่า *Sporobolomyces pararoseus* TISTR5213 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด คือ 5.21 ± 0.39 , 1.72 ± 0.16 และ 1.77 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 1.04 ± 0.14 , 0.30 ± 0.02 และ 0.51 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ในอาหารยีสต์-มอลต์สกัด อาหารสูตรพื้นฐานที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ จากการศึกษาผลกระทบขององค์ประกอบของอาหารสูตรพื้นฐานที่มีกลีเซอรอลเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สีแดงที่คัดเลือกได้โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman พบว่ากลีเซอรอลเหลือทิ้ง ยีสต์สกัด และ ไคโทแซนเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต มีผลต่อการเจริญของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นสูงกว่า 95% ($p < 0.05$) และกลีเซอรอลเหลือทิ้ง เป็นเพียงปัจจัยเดียวเท่านั้นที่มีผลกระทบต่อการผลิตแคโรทีนอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นสูงกว่า 95% ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีผลทั้ง

ต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์พบว่ากลีเซอรอลเหลือทิ้ง เป็นเพียงปัจจัยเดียวเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นสูงกว่า 99% ($p < 0.01$) จากนั้นนำปัจจัยที่คัดเลือกได้คือ กลีเซอรอลเหลือทิ้งไปหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมได้แก่ ระดับพีเอชและอุณหภูมิโดยใช้แผนการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนองโดยการออกแบบโดย central composite design (CCD) และรูปแบบสมการกำลังสองที่สร้างขึ้นจากการออกแบบโดย CCD พบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลและอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นสูงกว่า 95% ($p < 0.05$) สูตรอาหารที่มีกลีเซอรอลเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้จากการออกแบบการทดลองนี้ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นจาก 1.77 เป็น 53.70 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเพิ่มขึ้น 2,933.90% จากอาหารสูตรเดิม สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ คืออาหารสูตรพื้นฐานที่เพิ่มปริมาณกลีเซอรอลเหลือทิ้งเป็น 55.04 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นที่ 5.63 และทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24.01 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

จากการศึกษาการขยายขนาดการผลิตแคโรทีนอยด์โดยการหมักแบบเบทซ์ในถังหมักแบบอากาศยกขนาด 3.0 ลิตร ด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้โดยใช้อาหารสูตรพื้นฐานที่มีกลีเซอรอลเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาตร 2.0 ลิตร ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมพีเอชและไม่ควบคุมพีเอช พบว่าภายใต้สภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอชสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ 46.67 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 6.73 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนสภาวะที่มีการควบคุมพีเอชไว้ที่ 5.63 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดได้ 46.08 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 14.11 ± 0.07 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน นอกจากนี้แล้วการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมของอาหารสูตรพื้นฐานที่มีกลีเซอรอลเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและช่วยลดต้นทุนการผลิตลดลงจาก 8.56 เหลือ 0.29 บาทต่อมิลลิกรัมแคโรทีนอยด์ต่อลิตรอาหารหรือลดลงประมาณ 2,850% เมื่อเทียบกับอาหารสูตรเดิม จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีศักยภาพสูงที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์

คำสำคัญ : แคโรทีนอยด์, Plackett-Burman design, central composite design (CCD), กลีเซอรอลเหลือทิ้ง, *Sporobolomyces pararoseus* TISTR5213

Thesis Title	Optimization of Carotenoids Production by Yeasts Using Waste Glycerol from Biodiesel Production Process as a Carbon Source
Author	Miss Atchara Manowattana
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Advisor	Dr. Thanongsak Chaiyaso

Abstract

Recycling waste glycerol obtained from biodiesel production has challenges, particularly as this glycerol is not suitable for foods and cosmetics applications. Therefore, fourteen strains of red yeasts from the culture collection of Thailand Institute Scientific and Technological Research (TISTR) were screened for carotenoids production in a yeast malt-extract medium (YM), basal medium supplemented with pure glycerol (BMP) and basal medium supplemented with waste glycerol (BMW) as a sole carbon source. The results showed that eleven strains could grow and produce carotenoids in YM while only nine strains were observed in BMP and BMW.

Therefore, nine strains of red yeasts found that *Sporobolomyces pararoseus* TISTR5213 produced the maximum total carotenoids of 5.21 ± 0.39 , 1.72 ± 0.16 and 1.77 ± 0.01 mg/L or 1.04 ± 0.14 , 0.30 ± 0.02 and 0.51 ± 0.06 mg/g in YM, BMP and BMW, respectively. Variable medium components of BMW were selected in accordance with the Plackett-Burman experimental design. Three factors including waste glycerol, yeast extract and K_2HPO_4 were affected on DCW with confidence levels more than 95.0%, while waste glycerol was the only one factor affected on total carotenoids content with the confidence level more than 95.0%. The results revealed that both DCW and total carotenoids content responses were selected in accordance with only one factor of waste glycerol being significant with the confidence level more than 99.0%. The optimal conditions of physical factors (pH and temperature

levels) were then combined in further studies through the response surface methodology approach. A quadratic model was constructed by central composite design (CCD). It revealed that, glycerol concentration and temperature were significant and influenced on the content of total carotenoids ($p < 0.05$). Using experimental designs, the total carotenoids production yield increased from 1.77 to 53.70 mg/L or about 2,933.90% higher than un-optimized BMW. The optimal conditions to achieve maximum yield of total carotenoids were; waste glycerol 55.04 g/L, initial pH at 5.63 and 24.01°C for 5 days.

The scale-up of carotenoids production was investigated by both fermentation carried out in 3.0 L air-lift fermentor containing of 2.0 L optimized BMW under the control and uncontrolled pH conditions. The total carotenoids production yield of 46.67 ± 0.31 mg/L and DCW of 6.73 ± 0.06 g/L were obtained at days 5 of cultivation periods under uncontrolled pH condition while the controlled pH condition at pH 5.63 showed the total carotenoids production yield of 46.08 ± 0.11 mg/L and DCW of 14.11 ± 0.07 g/L at days 7 of cultivation periods. Moreover, this study found that the optimized BMW could enhance the carotenoids production yield, so the production cost was dramatically decreased from 8.56 to 0.29 Baht/mg/L or about 2,850% reduction. This result indicates that waste glycerol from biodiesel production process shows high potential as a sole of carbon for carotenoids production.

Keywords : carotenoids, Plackett-Burman design, central composite design, waste glycerol, *Sporobolomyces pararoseus* TISTR5213