

Thesis Title Optimization of Culture Medium and Culture Conditions for Biomass and Metabolite Production from *Pichia pastoris* GS115 Using Glycerol as Carbon Source

Author Miss Kamoldara Reansuwan

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Charin Techapun

ABSTRACT

Glycerol is a byproduct with abundant amount from biodiesel production. It has long been used as a major carbon source in culture medium for the cultivation of microorganisms in industrial fermentation. In this studied would like to used glycerol as a sole carbon source for biomass and metabolite production. Optimization of culture medium for metabolite production from *Pichia pastoris* GS115 by using glycerol as carbon source was studied. It was found that *P. pastoris* can produced acetic acid, ethanol and citric acid. Type of fermentative metabolite was depend on nitrogen source and inorganic salt in culture medium. The production of acetic acid

citric acid and ethanol were achieved when peptone was used. Citric acid and ethanol were achieved when yeast extract was used, while only production of ethanol was obtained on beef extract. Furthermore, only acetic acid was obtained when using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as inorganic nitrogen source. However production of metabolite was not found when NH_4Cl , NH_4NO_3 and Urea were used. Effect of inorganic salts on the production of metabolites was studied. It was found that medium containing each kind of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 and KCl can promoted ethanol production, while KH_2PO_4 promoted ethanol and citric acid production. The medium components were optimized by using the Central Composite Design (CCD). The optimum medium composition was composed of 28.33 g/L glycerol, 8.5 g/L peptone 5.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.5 g/L KH_2PO_4 . The maximum cell dried weight of 8.66 g DCW/L biomass was produced by used this medium in shake flask. Effects of fermentation condition including temperature and initial pH on biomass production in shake flask have been studied. Found that, the optimum culture condition of temperature and pH were 30°C and 5.5 respectively. After optimization conditions, biomass in fermenter was as twice as that in shake flask and maximum biomass production of 18.93 g DCW/L and a yield coefficient of 0.67 g biomass/g of glycerol can be obtained in fermenter. These results demonstrate the potential of using glycerol as the carbon source in high cell density cultivation of *P. pastoris* GS115 and possibly metabolite products in future study.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ
ผลิตมวลเซลล์และสารเมทาบอลไลท์ จากเชื้อ *Pichia*
pastoris GS115 โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ผู้เขียน

นางสาวกมลดารา เจริญสุวรรณ

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชรินทร์ เตชะพันธุ์

บทคัดย่อ

เนื่องจากปัจจุบันกลีเซอรอล ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีปริมาณเพิ่มขึ้น และมันถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในทางอุตสาหกรรมมาเป็นระยะเวลาอันยาวนานแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตมวลเซลล์และสารเมทาบอลไลท์ จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารเมทาบอลไลท์จาก *Pichia pastoris* GS115 โดยใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตกรดอะซิติก เอทานอลและ กรดซิตริกได้ โดยชนิดและปริมาณของสารเมทาบอลไลท์ที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจนและเกลือที่เติมลงไป เมื่อศึกษาผลของอินทรีย์ไนโตรเจนต่อการผลิตสารเมทาบอลไลท์ของ *Pichia pastoris* GS115 พบว่าการใช้เปปโตินสามารถผลิตกรดอะซิติก กรดซิตริกและเอทานอลได้ ในขณะที่การใช้สารสกัดจากยีสต์จะพบการผลิตเพียงกรดซิตริกและเอทานอล และการใช้สารสกัดจากเนื้อวัวจะมีการผลิตเฉพาะเอทานอลเพียงชนิดเดียว ส่วนผลของการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตมีการสร้างกรดอะซิติกเพียงอย่างเดียว ในขณะที่การใช้ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรด และยูเรีย ไม่มีการผลิตสารเมทาบอลไลท์ ผลของเกลือต่อการผลิตสารเมทาบอลไลท์ พบว่าเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต

แคลเซียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมคลอไรด์ พบว่ามีการสร้างเอทานอล ส่วนการใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จะมีการผลิต เอทานอลและกรดซิตริก เมื่อศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวลเซลล์โดยใช้วิธี Central Composite Design (CCD) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตมวลเซลล์ประกอบด้วย กลีเซอรอล 28.33 กรัมต่อลิตร เปปโทน 8.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 5.0 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์ได้ 8.66 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาผลของสภาวะในการเพาะเลี้ยงในฟาสก์ต่อการผลิตมวลเซลล์ ได้แก่ อุณหภูมิในการหมัก และ pH เริ่มต้นของอาหาร ผลปรากฏว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น เท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที หลังจากการศึกษาส่วนประกอบของอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยงพบว่า มวลเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมัก เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าจากการเพาะเลี้ยงในฟาสก์ โดยได้มวลเซลล์สูงสุด 18.93 กรัมต่อลิตร และประสิทธิภาพในการผลิตเท่ากับ 0.67 กรัมของมวลเซลล์/กรัมของกลีเซอรอล เกิดขึ้นที่การเพาะเลี้ยงในถังหมัก จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงแนวทางการประยุกต์ใช้กลีเซอรอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* GS115 และมีความเป็นไปได้สำหรับการผลิตสารเมตาบอไลต์ สำหรับการศึกษาในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved