

เกรียวทริกกุล กลิ่นสน. 2556. การสะสมไขมันของยีสต์ทนร้อน *Pichia* sp. Scj 01 โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ. ดร. วิชัย สิวลาวัชรมาศ

บทคัดย่อ

กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนับได้ว่าเป็นของเหลือทิ้งอุตสาหกรรมชนิดหนึ่ง เมื่อความต้องการไบโอดีเซลเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้การผลิตไบโอดีเซลเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นปริมาณกลีเซอรอลจึงสูงขึ้นเช่นกัน เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีการนำไปใช้ประโยชน์น้อยและต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดสูง จึงจัดได้ว่ากลีเซอรอลเป็นของเสียอย่างหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงได้มีความสนใจที่จะนำเอากลีเซอรอลมาใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาการสะสมไขมันของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Pichia* sp. Scj 01 ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลและเป็นการนำเอาของเสียจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเองกลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เช่น การผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่องโดยนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นของเหลือทิ้งมาใช้ในการกระบวนการผลิต หากมีการทำสมดุลมวลอย่างเหมาะสม

จากการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน *Pichia* sp. Scj 01 ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูง โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนออกแบบการทดลองทางสถิติโดยวิธี Plackett burman เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์ โดยปัจจัยที่นำมาใช้ในการออกแบบการทดลองมีด้วยกันทั้งหมด 5 ปัจจัย คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ปริมาณกลีเซอรอล อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความเร็วรอบในการเขย่า พบว่า ต้นแบบ (Model) การออกแบบการทดลอง ให้ค่า p -value เท่ากับ 0.0007 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าปัจจัยที่นำมาใช้ในการศึกษามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณไขมันที่สะสมให้ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ส่วนปัจจัยทั้ง 4 มีผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ควรนำปัจจัยเหล่านี้มาศึกษาต่อเพื่อความแม่นยำ และจากนั้นนำปัจจัยต่างๆ มาออกแบบการทดลองด้วย Central Composite Design (CCD) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถผลิตไขมันได้สูงสุดคือสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบ/นาที ระยะเวลาในการบ่ม 6 วัน ในอาหาร Production medium ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน สามารถทำให้ยีสต์ *Pichia* sp. Scj 01 ผลิตไขมันได้สูงสุดคือ 1.19 กรัม/ลิตร หรือ 40.88 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อนำไปขยายระดับการหมักในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร โดยมีปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ด้วยการหมักแบบกะ ภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะสมโดยเพิ่มอากาศเข้าไปในกระบวนการหมัก 1 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที (vvm) พบว่ายีสต์ *Pichia* sp. Scj 01 สามารถสะสมไขมันได้ 2.99 กรัม/ลิตร หรือ 63.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งและมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 4.71 กรัม/ลิตร ในระยะเวลาการบ่ม 4 วัน องค์ประกอบของกรดไขมันที่ได้จากการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยยีสต์ *Pichia* sp. Scj 01 ประกอบด้วยกรดไขมันหลักคือ กรดโอเลอิก (Cis-9-Oleic acid: C18:1n9c) กรดปาล์มิติก (Palmitic acid: C16:0) กรดอีโคซาไดโนอิก (Cis-11,14-Eicosadienoic acid: C20:2) และกรดลิโนเลอิก (Cis-9, 12-Linoleic acid: C18:2n6) จากนั้นนำสภาวะที่ได้ดังกล่าวมาทดสอบการผลิตไขมันเปรียบเทียบในระดับฟลักส์ ระหว่างอาหารที่เติม

กลีเซอรอลบริสุทธ์และกลีเซอรอลดิบที่ความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 40 กรัม/ลิตร พบว่าเชื้อยีสต์ *Pichia* sp. Scj 01 สามารถผลิตไขมันได้ 1.35 และ 0.106 กรัม/ลิตร หรือ 41.50 และ 36.99 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แต่เมื่อลดความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบลงเหลือ 22.24 กรัม/ลิตร เชื้อยีสต์ *Pichia* sp. Scj 01 สามารถผลิตไขมันได้สูงขึ้นคือ 1.17 กรัม/ลิตร หรือ 41.50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ดังนั้นเชื้อยีสต์ทนร้อน *Pichia* sp. Scj 01 มีความสามารถในการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนได้ใกล้เคียงจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลีเซอรอลบริสุทธ์

Kreawthriggul Klinson. 2013. **Lipid Accumulation in Thermotolerant Yeast *Pichia* sp. Scj 01 Using Glycerol as Substrate**. Master of Science Thesis in Biotechnology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisor: Asst. Prof. Dr. Vichai Leelavacharamas

ABSTRACT

Glycerol which is a by-product from biodiesel manufacturing has been represented as an industrial waste product. When the demand for biodiesel increases, resulting in the increase of biodiesel production and high amount of glycerol. Due to the limited use and high costs for disposing, so glycerol could be classified as one of the industrial waste product which could course some effects to the environment. The intention of this study is using glycerol as substrate for lipid accumulation by thermotolerant yeast *Pichia* sp. Scj 01. This could not only reduce the biodiesel production cost, but could also utilize the waste from the biodiesel production process to get the maximum profit, e.g.: continuous production of biodiesel by utilizing glycerol which is the waste from the production process (if mass balance between substrate (glycerol) and product (biodiesel) has been optimized).

Statistical based experimental designs to optimize fermentation conditions for single cell oil production from glycerol by thermotolerant yeast *Pichia* sp. Scj 01 were conducted. Initial screening of important factors influencing single cell oil production, i.e. inoculum size, (%), initial glycerol (%), temperature (°C), initial pH and agitation speed (rpm), were tested by the Plackett-Burman method. Results indicated that the model showed statistically significant ($p=0.0007$) which could be concluded that the studied influencing factors had some effects on lipid accumulation. However, only temperature (°C) showed statistically significant ($p=0.0001$) and had an interdependent effect on lipid content. On the other hands, another factors had no significantly effect on lipid content. Further experiment was designed to optimize variables from Plackett-Burman design, which were temperature, initial glycerol (%), inoculum size (%) and initial pH, in order to maximize the lipid content and to determine the interaction effects among the tested variables by using Central Composite Design (CCD) of RSM (Response Surface Methodology). It was found that the optimal conditions for lipid accumulation at 100 rpm agitation were 40 °C, 4% initial glycerol, 1% inoculum size and pH 6.0, in which the obtained lipid content of 1.19 g/l or 40.88% (w/w) on the cell dry weight basis was estimated. Scaling up to a 5 l fermenter with the working volume of 3 l in the batch cultivation under the optimized conditions and feeding air at 1 vvm found that *Pichia* sp. Scj 01 could accumulate highest lipid content at 2.99 g/l or 63.52% (w/w) on the cell dry weight basis after 4 days of cultivation. Fatty acids composition when pure glycerol was used by *Pichia* sp. Scj01 were mainly cis-9-Oleic acid (C18:1n9c) Palmitic acid (C16:0) cis-11, 14-Eicosadienoic acid (C20:2) and cis-9, 12-Linoleic acid (C18:2n6). Comparing of lipid accumulation by *Pichia* sp. Scj 01 between utilizing pure glycerol

and crude glycerol as carbon sources was further studied. Pure glycerol and crude glycerol were prepared at an initial glycerol of 40 g/l for lipid accumulation. It was found that *Pichia* sp. Scj 01 could accumulate lipids of 1.35 and 0.106 g/l or 41.50 and 36.99% (w/w) on the cell dry weight, respectively. When crude glycerol was decreased to 22.24 g/l, lipid accumulation could be increased to 1.17 g/l or 41.50% (w/w) on the cell dry weight. Thus, single cell oil production from crude glycerol by thermotolerant oleaginous yeasts *Pichia* sp. Scj 01 had a potential for biodiesel production.