กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในหัวข้อเรื่อง กระบวนการประยุกต์ใช้กลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2552 โดยในงานวิจัยได้มุ่งในการนำกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแหล่งอาหารสำหรับหระบวนการผลิตสารสำคัญที่มีมูลค่าสูงคือ แอสตาแซนทิน (astaxanthin) ซึ่งสารแอสตาแซนทินนี้เป็นสารสีธรรมชาติที่มีคุณประโยชน์มากโดยเฉพาะการมีคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีฟทธิ์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งหรือเซลล์ถูกทำลาย สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการผลิตแอสตาแซนทินโดยการประยุกต์ใช้ผลพลอยได้จากกระบวนผลิตในทางด้านอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการผลิตสารและเป็นการลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากปริมาณของผลพลอยได้ที่มีมากด้วย งานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมหรือจากกระบวนการผลิตเพื่อนำมาใช้ในการผลิตสารที่มีมูลค่าสูงได้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นในการประยุกต์ใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตแอสตาแซนทินโดยเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* โดยได้นำกลีเซอรอลผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์เพื่อแยกสารปนเปื้อนออกได้ พบสามารถทำบริสุทธิ์กลีเซอรอลได้ปริมาณกลีเซอรอลเท่ากับร้อยละ 86.53 จากนั้นประยุกต์ใช้กลีเซอรอลในกระบวนการผลิตแอสตาแซนทิน โดยการใช้ทดแทนกลูโคสในอาหารสำเร็จรูป และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเปรียบเทียบกับอาหารสำเร็จรูป YM พบว่าสามารถใช้ทดแทนกลูโคสได้ โดยพบน้ำเซลล์แห้งและปริมาณแอสตาแซนทินเท่ากับ 2.90 กรัมต่อลิตร และ 0.170 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารพบเชื้อมีการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินได้เท่ากับ 6.66 กรัมต่อลิตรและ 3.407 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 264 และ 276 ชั่วโมงตามลำดับ นอกจากนี้ได้หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอสตาแซนทินเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 144 ชั่วโมง และได้ปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous* ได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งจากงานวิจัยจะเห็นได้ว่าสามารถประยุกต์ใช้กลีเซอรอลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตแอสตาแซนทินได้

Abstract

The aim of this research is to applied glycerol that abundant by product from biodiesel production using as carbon source for astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Glycerol was purified by eliminating impurities and obtained 86.53% of purified glycerol. After that, purified glycerol was applied by adding in culture medium instead of glucose and using as single carbon source for astaxanthin production. The growth and axtaxanthin content presented in the high values when cultured in medium that contained glycerol as carbon source. Biomass and astaxanthin content were 6.66 g/L and 3.407 mg/L, for cultivation time of 264 and 276 h, respectively. Compared with culture medium contained glycerol instead of glucose that obtained lower biomass (2.90 g/L) and axtaxanthin content (0.170 mg/L). The optimum condition for astaxanthin production on glycerol as carbon source medium was also investigated. The results indicated that the glycerol concentration of 30 g/L with initial pH 6.0 cultured at 20°C for 144 h was the optimal condition. For improving the produced astaxanthin of *X. dendrorhous* by various nitrogen sources, yeast extract, peptone and ammonium sulfate presented the high astaxanthin yield. This research evaluated that glycerol from biodiesel produciton could be use as carbon sources for astaxanthin production.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก

บทคัดย่อ ข

Abstract ค

สารบัญ ง

สารบัญตาราง ช

สารบัญรูป ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

1.4 แนวทางการดำเนินการวิจัย 3

1.5 ระยะเวลาทำการวิจัย 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 สารแอสตาแซนทิน (astaxanthin) 5

2.1.1 สมบัติทั่วไปของสารแอสตาแซนทิน 5

2.1.2 บทบาทและความสำคัญของสารแอสตาแซนทินในอุตสาหกรรมต่าง ๆ 6

2.1.3 แหล่งที่พบสารแอสตาแซนทิน 7

2.1.4 เชื้อจุลินทรีย์ผลิตสารแอสตาแซนทินในงานวิจัย 8

2.1.5 การผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* 8

2.2 กลีเซอรอล (glycerol) 13

2.2.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล 13

2.2.2 ขั้นตอนการทำกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์ 15

2.3 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง 17

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 21

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 21

3.2 กลีเซอรอลดิบ 21

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ 21

3.4 สารเคมี 21
3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ 22
3.6 วิธีดำเนินการทดลอง 23
3.6.1 การเตรียมกลีเซอรอลดิบเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน 23
3.6.2 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทิน จากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหาร YM 24
3.6.3 การประยุกต์ใช้กลีเซอรอลสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* 26
3.6.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* 27
3.6.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนทินเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 28
3.6.6 การปรับปรุงคุณภาพของอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous* 29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 30
4.1 การศึกษาองค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบและการทำบริสุทธิ์บางส่วนของกลีเซอรอล 30
4.1.1 องค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบ 30
4.1.2 การทำบริสุทธิ์กลีเซอรอลดิบ 31
4.2 การเจริญเติบโตและการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 33
4.2.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารแอสตาแซนทินจากเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหาร YM 33
4.2.2 การเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 35
4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเชื้อ *X. dendrorhous* TISTR 5730 44
4.3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอสตาแซนทินด้วยการหาสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสง (Absorbtion spectra) 44
4.3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอสตาแซนทินด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง (HPLC) 45
4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลตาแซนทินเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 47

4.4.1 ความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของกลีเซอรอลในการผลิตแอสตาแซนทิน 47

4.4.2 ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแอสตาแซนทิน 48

4.4.3 การเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่เหมาะสม 49

4.5 การปรับปรุงคุณภาพของอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มการผลิตแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* 50

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 52

เอกสารอ้างอิง 54

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงองค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบ	30
4.2 องค์ประกอบของส่วนผสมในขั้นตอนการทำกลีเซอรอลบริสุทธิ์	32
4.3 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous*	34
4.4 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหาร YM ที่ใช้กลีเซอรอลทดแทนกลูโคส	36
4.5 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน	39
4.6 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณแอสตาแซนทินสูงสุดที่เชื้อ *X. dendrorhous* ผลิตได้ในอาหารทั้ง 3 สูตร	41
4.7 แสดงผลของปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นในกระบวนการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous*	48
4.8 ผลของค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous*	49
4.9 การเจริญและการผลิตแอสตาแซนทินของ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม	50
4.10 การปรับปรุงคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเพิ่มการเจริญและผลิตแอสตาแซนทินด้วยแหล่งไนโตรเจน	51

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 เซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* 9

2.2 Astaxanthin glubules ในเซลล์ยีสต์ *X. dendrorhous* 10

2.3 แผนผังกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 14

4.1 แสดงการแยกชั้นขององค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบใน ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์กลีเซอรอล 31

4.2 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหาร YM โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที 34

4.3 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลทดแทนกลูโคส โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150รอบต่อนาที 37

4.4 แสดงการเจริญและการผลิตสารแอสตาแซนทินของเชื้อ *X. dendrorhous* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที 40

4.5 แสดงสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารแอสตาแซนทินที่เชื้อ *X. dendrorhous* ผลิต ได้ที่ความยาวคลื่น 300-700 นาโนเมตร ก.) สารมาตรฐานแอสตาแซนทิน ข.) สาร แอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ค.) สารแอสตาแซนทินที่เชื้อผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 44

4.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารแอสตาแซนทิน ก) สารมาตรฐานแอสตาแซนทินข) สารสกัดแอสตาแซนทินจากอาหาร YM ค) สารสกัดแอสตาแซนทินจากอาหารที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 46