การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลของ *Rhodococcus opacus* PD630

The Study of Appropriate Type and Concentration of Carbon and Nitrogen Sources Affecting Biomass Production of *Rhodococcus opacus* PD630

น.ส. เพชรัตน์ แย้มผ่อง, น.ส. อภิชญา ศิริผล

รศ. ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทร. 02-9428555 ต่อ 1203 และ1204 โทรสาร 02-5614621 E-mail: fengpjs@ku.ac.th

บทคัดย่อ

โครงงานนี้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ที่มีต่อการผลิตชีวมวลของแบคทีเรีย *Rhodococcus opacus* PD630 ทำการทดลองโดยเติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ ไตรโซเดียมซิเตรต และกลีเซอรอล ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มเกลือแร่ (Mineral medium) จากนั้นหมักโดยใช้แบคทีเรีย 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้ไตรโซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว *R. opacus* PD630 ผลิตชีวมวลสูงสุด ได้มากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเดียวกัน จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของไตรโซเดียมซิเตรต เพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญ พบว่าความเข้มข้นของไตรโซเดียมซิเตรตที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญคือ 15 กรัมต่อลิตร จากนั้นเลือกความเข้มข้นของไตรโซเดียมซิเตรตที่ทำให้ได้ชีวมวลสูงสุดคือ 10 กรัมต่อลิตร มาทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากัน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มเกลือแร่ พบว่า การใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ชีวมวลสูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการทดลองของแอมโมเนียมคลอไรด์คือ 1.5 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ: *Rhodococcus opacus* PD630, ไตรโซเดียมซิเตรต, แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต

Abstract

This project studies about the effect of carbon sources and nitrogen sources in the fermentation broth to increase the biomass of *Rhodococcus opacus* PD630. The experiment uses two different carbon sources – glycerol and trisodium citrate at the same concentration of 10 g/L. The carbon source was added into Mineral Medium and fermented at 30 degree Celsius with the shaking rate of 200 rpm for 72 hours using 5% (by volume) of *R. opacus* PD630 inoculum. The result shows that the use of trisodium citrate as a carbon source gives the higher maximum biomass than glycerol at the same concentration of 10 g/L. Then trisodium citrate was chosen to find substrate inhibition concentration. The concentration of 5, 10, 15, 20 g/L were adding into Mineral Medium and fermented at the same condition. The result shows that the maximum concentration of trisodium citrate before the substrate inhibition occurs at 10 g/L. Then the concentration of trisodium citrate was fixed and the concentration of nitrogen sources was varied. The experiment uses two different nitrogen sources – ammonium chloride and ammonium sulfate at the same carbon per nitrogen ratio. It was founds that the used of ammonium chloride as nitrogen source gives the maximum biomass higher than the used of ammonium sulfate. And the appropriate concentration of ammonium chloride is 1.5 g/L.

Keywords: *Rhodococcus opacus* PD630, Trisodium citrate, Ammonium chloride, Ammonium sulfate

1. บทนำ

ในปัจจุบัน ความต้องการในการใช้พลังงานเพิ่มขึ้น รวมถึงน้ำมันที่มีความต้องการใช้มากเช่นกัน ทำให้ปริมาณน้ำมันลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้น ในปัจจุบันจึงมีการคิดค้นพลังงานทางเลือกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งไบโอดีเซลเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้เป็นแหล่งพลังงาน แต่การจะผลิตไบโอดีเซลยังมีข้อจำกัด เนื่องจากไบโอดีเซลส่วนใหญ่ในปัจจุบันมักจะผลิตจากน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ ทำให้ต้องสูญเสียพื้นที่ทางการเกษตรเพื่อที่จะปลูกพืชน้ำมัน ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยจึงเริ่มคิดค้นหาวิธีการอื่นๆเพื่อผลิตน้ำมันเพิ่มมากขึ้น และจุลินทรีย์เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตน้ำมันได้ (Alvarez และคณะ,2000) จึงเกิดเป็นโครงงานนำร่องในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตน้ำมัน ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานนี้ คือ *R. opacus* PD630 ซึ่งสามารถผลิตน้ำมันได้เช่นกัน โดยแหล่งอาหารหลักของจุลินทรีย์ คือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน จึงมีการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน 2 แหล่งคือ ไตรโซเดียมซิเตรต ซึ่งเป็นองค์ประกอบอยู่ในน้ำเสียของกลุ่มโรงงานผลิตกระดาษ และกลีเซอรอล ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของการผลิตไบโอดีเซล นอกจากนี้ ยังเปรียบเทียบผลการเติมแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่งเช่นกัน คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ที่มีอยู่ในสูตรอาหาร และแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งใช้มากในเชิงอุตสาหกรรม และมีราคาต่ำ

2. วิธีการทดลอง

จุลินทรีย์: *Rhodococcus opacus* PD630 จาก Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ประเทศเยอรมัน

สภาวะในการหมัก: *R.opacus* PD630 หมักที่อุณหภูมิ 30 ˚C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ขวดรูปชมพู่ (Flask) แต่ละขวดจะประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มเกลือแร่ (Mineral Medium) 50 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ ไตรโซเดียมซิเตรต หรือกลีเซอรอล และใช้แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ หรือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นต่างๆ

วิธีการวัดผล: วิธีวัดการเจริญของจุลินทรีย์ ทำได้โดยใช้วิธีการวัดน้ำหนักแห้ง (Dry cell Weight) โดยเก็บผลทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.1 การศึกษาผลการเติมแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลของ *R. opacus* PD630

เติมไตรโซเดียมซิเตรตและกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นเท่ากัน คือ 10 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มเกลือแร่ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ จากนั้นนำไปลงเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เปรียบเทียบปริมาณชีวมวลของ *R. opacus* PD630 เลือกแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ *R. opacus* PD630 ผลิตชีวมวลได้มากกว่าคือ ไตรโซเดียมซิเตรต ไปทำการทดลองต่อในตอนที่ 2

2.2 การหาความเข้มข้นของไตรโซเดียมซิเตรตที่ทำให้เกิดการยับยั้งเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการทดลองโดยใช้แหล่งคาร์บอนคือ ไตรโซเดียมซิเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ในโครงงานนี้ใช้ความเข้มข้นของไตรโซเดียมซิเตรต คือ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร โดยจะใช้ความเข้มข้นก่อนที่จะเกิดการยับยั้งเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการทดลองในตอนที่ 3

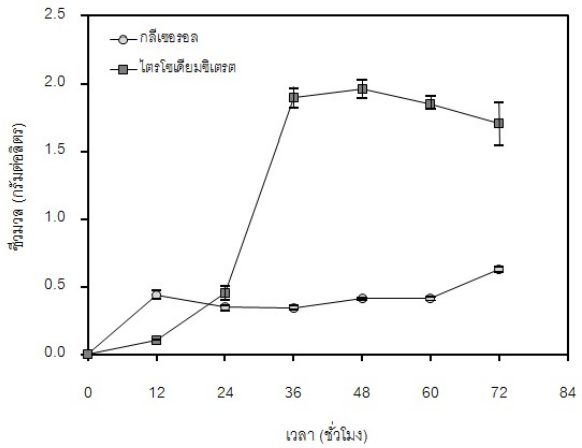
2.3 การศึกษาผลการเติมแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด และการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลของ *R. opacus* PD630

ทดลองโดยใช้แหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 10.73 แล้วจึงนำแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ *R. opacus* PD630 ผลิตชีวมวลได้มากกว่ามาทำการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม

3. ผลการทดลอง

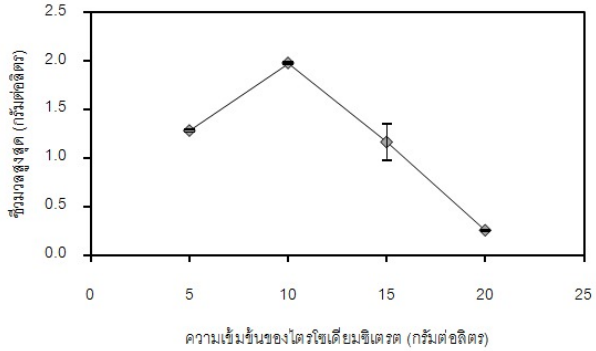
3.1 การศึกษาผลการเติมแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลของ *R. opacus* PD630

จากรูปที่ 1 การใช้ไตรโซเดียมซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ปริมาณชีวมวลสูงสุด คือ 1.960 กรัมต่อลิตร และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ปริมาณชิวมวลสูงสุดคือ 0.630 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นเกลือของกรดซิตริกได้ง่ายกว่ากลีเซอรอล (Alvarez และคณะ, 1996) ดังนั้นจึงเลือกไตรโซเดียมซิเตรตมาทำการทดลองต่อในการหาการยับยั้งเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 1 ปริมาณชีวมวลของ *R. opacus* PD630 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มเกลือแร่ และใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นเท่ากัน คือ 10 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บผลที่เวลาต่างๆ

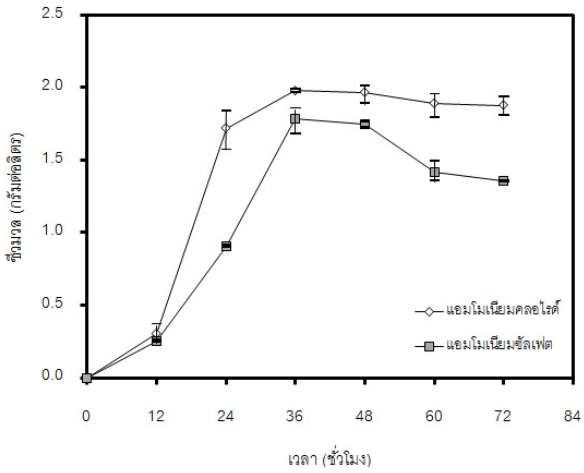
3.2 การหาความเข้มข้นของไตรโซเดียมซิเตรตที่ทำให้เกิดการยับยั้งเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 2 กราฟชีวมวลสูงสุดของ *R. opacus* PD630 เมื่อหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มเกลือแร่ และใช้แหล่งคาร์บอน คือ ไตรโซเดียมซิเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากรูปที่ 2 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไตรโซเดียมซิเตรตมากขึ้นจาก 5 เป็น 10 กรัมต่อลิตรแล้ว จะได้ปริมาณชีวมวลสูงสุดมากขึ้น แต่เมื่อเราเพิ่มความเข้มข้นจาก 10 ไปเป็น 15 และ 20 กรัมต่อลิตรแล้ว ปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ได้กลับลดลง ซึ่งเกิดจากการที่อาหารมีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมากเกินไป ทำให้เกิดเป็นสารมัธยันต์ (Intermediate) และไม่เกิดปฏิกิริยา (Kargi และ Shuler, 2002) ทำให้ปริมาณชีวมวลของ *R. opacus* PD630 ลดลง กล่าวคือความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 15 กรัมต่อลิตร

3.3 การศึกษาผลการเติมแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด และการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลของ *R. opacus* PD630

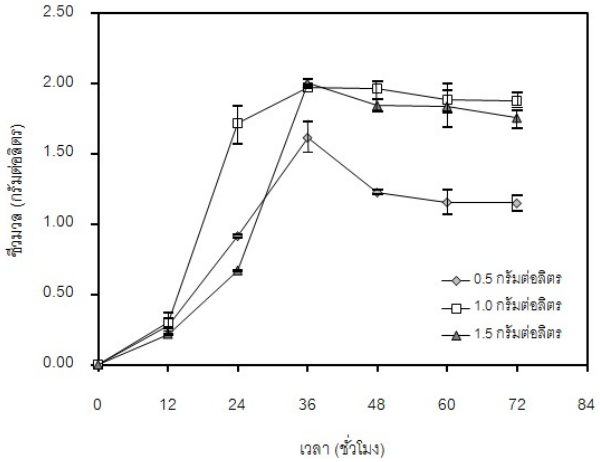


รูปที่ 3 กราฟชีวมวลของ *R. opacus* PD630 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มเกลือแร่ ใส่ไตรโซเดียมซิเตรตที่มีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากันคือ 10.73

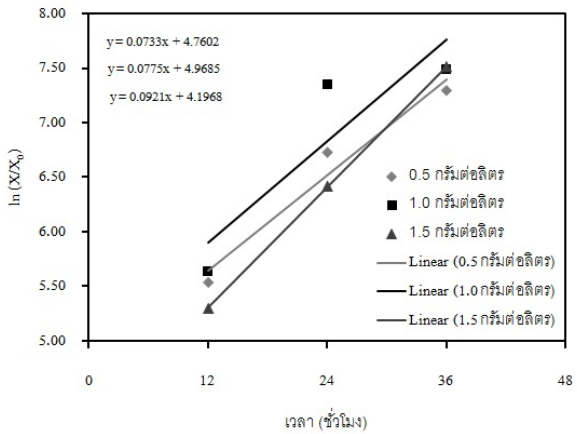
จากกราฟในรูปที่ 3 ชีวมวลที่ได้จากการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนมากกว่าชีวมวลที่ได้จากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตแทนแอมโมเนียมคลอไรด์ ทำให้ปริมาณคลอไรด์ในอาหารมีน้อยลง แบคทีเรียจึงเจริญได้ไม่ดีเท่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจึงเลือกแอมโมเนียมคลอไรด์มาทำการทดลองเพื่อดูการเจริญของ *R. opacus* PD630 เมื่อปริมาณไนโตรเจนเปลี่ยนแปลงไปได้ผลดังรูปที่ 4

จากรูปที่ 4 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ให้มากขึ้น จะได้ชีวมวลที่สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น *R. opacus* PD630 จึงเจริญได้ดีขึ้น โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร จะให้ชีวมวลสูงสุดที่เวลาเดียวกันคือ 36 ชั่วโมง และให้ปริมาณชีวมวลเท่ากับ 2.008, 1.978 และ 1.621 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากนั้นหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะของความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 โดยเขียนกราฟระหว่าง

$\ln(X/X_0)$ กับเวลา เมื่อ X คือชีวมวลที่เวลาต่างๆ (กรัมต่อลิตร) X_0 คือ ชีวมวลเริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 0.0011 กรัมต่อลิตรได้ดังรูปที่ 5



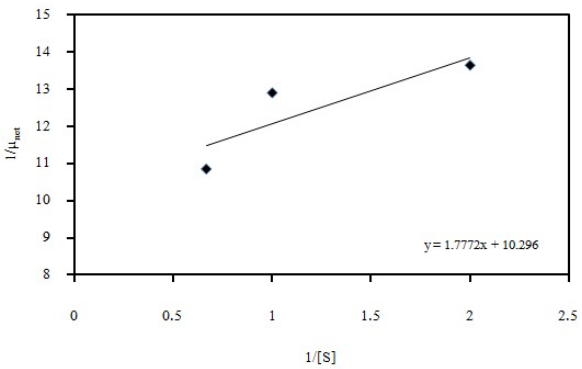
รูปที่ 4 กราฟชีวมวลของ *R. opacus* PD630 ที่เวลาต่างๆเมื่อหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มเกลือแร่ และใช้แหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 5 การหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ

จากกราฟในรูปที่ 5 จะได้อัตราการเจริญจำเพาะของความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร คือ 0.0733, 0.0775 และ 0.0921 ตามลำดับ เมื่อนำค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์มาเขียนกราฟกับส่วนกลับของอัตราการเจริญจำเพาะ ได้ดังรูปที่ 6

จากรูป จะได้สมการเส้นตรง y=1.7772x+10.296 ซึ่งจะได้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือ 0.0971 สังเกตได้ว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เป็น 1.5 แล้ว อัตราการเจริญจำเพาะมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด แสดงให้เห็นว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการทดลอง (สาโรจน์ และประวิทย์, 2538)



รูปที่ 6 การหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

4. สรุปผลการทดลอง

4.1 การใช้ไตรโซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จะทำให้แบคทีเรีย *R. opacus* PD630 ผลิตชีวมวลได้มากกว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเดียวกัน 3.1 เท่า

4.2 ความเข้มข้นของไตรโซเดียมซิเตรตที่ดีที่สุด ก่อนที่จะเกิดการยับยั้งเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 10 กรัมต่อลิตร

4.3 การใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ได้ชีวมวลสูงสุดมากกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมคลอไรด์คือ 1.5 กรัมต่อลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนการทำโครงงานในครั้งนี้ ขอบพระคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวกระบวนการที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ตลอดการทำโครงงาน

เอกสารอ้างอิง

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ, วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน1. จำนวน 2,000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. พิมพ์ที่โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2538.

Alvarez H. M., Fabritius D., Mayer F. and Steinbüchel A., 1996. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* stain PD360. Arch Microbiol, 165:377-386 p.

Alvarez H. M., Kalscheuer R. and Steinbüchel A., 2000. Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. Appl Microbiol Biotechnol, 54: 218-223 p.

Kargi F. and Shuler M. L., Bioprocess Engineering 2nd ed., Prentice Hill PTR, 2002, p. 178.