

ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันเซลล์เดียวของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TN1

Optimization of Single Cell Oil Production from *Bacillus subtilis* TN1

อทิพันธ์ เสียมไหม^{1,2}, เบนจามาต หนูแป้น³, กนกรัตน์ ไสสอาด^{3,*}
Atipan Siammai^{1,2}, Benjamas Nupan³, Kanokrat Saisa-ard^{3,*}

¹คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต อ.เมือง จ.ภูเก็ต 83000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาลอานามัน มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต อ.เมือง จ.ภูเก็ต 83000

³คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี 84100

*e-mail : kpoe_20@hotmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Bacillus subtilis* TN1 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทย จากการศึกษาพบว่าการใช้ไขมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เชื้อ *B. subtilis* TN1 สามารถเจริญและผลิตน้ำมันได้สูงสุด 3.41 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 59 ของปริมาณน้ำมันที่สกัดได้โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อวิเคราะห์น้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TN1 ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีพบว่าน้ำมันประกอบด้วยกรดไขมันหลัก 4 ชนิดคือ กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก กรดลอริก และกรดปาล์มมิก จากผลการศึกษพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TN1 มีศักยภาพในการนำมาผลิตน้ำมันเซลล์เดียวเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

คำสำคัญ : *Bacillus subtilis* น้ำมันเซลล์เดียว ไบโอดีเซล กรดไขมัน

Abstract

The aim of this research was to optimize the conditions for growth and oil production from *Bacillus subtilis* TN1, isolated from palm oil industry waste in southern of Thailand. The study found that the optimum conditions were 5% (w/v) of palm oil as a carbon source, using NaNO_3 0.7% (w/v) as a nitrogen source. The initial pH was adjusted to 7.0, at room temperature ($30\pm3^\circ\text{C}$) and 200 rpm. The result shown *B. subtilis* TN1 gave the highest oil production of 3.41 g/L and 59% (dry weight) for lipid and lipid content, respectively. Gas chromatography analysis revealed that lipids from *B. subtilis* TN1 contained four major

constituent fatty acids were oleic acid, linoleic acid, lauric acid and palmitic acid that are comparable to conventional vegetable oil. Based on these compositional data, single cell oils or microbial lipids from *B. subtilis* TN1 are a potential alternative oil feedstock for biodiesel production.

Keywords : *Bacillus subtilis*, single cell oil, biodiesel, fatty acid

1. บทนำ

ปัจจุบันความต้องการใช้พลังงานเชื้อเพลิงในภาคอุตสาหกรรมและการขนส่งมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่น้ำมันเชื้อเพลิงจากซากฟอสซิลมีจำนวนจำกัดและนับวันจะยิ่งลดลง การพิจารณาหาแหล่งพลังงานใหม่ๆ เพื่อใช้ทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมจึงเป็นสิ่งที่สำคัญและได้รับการผลักดันจากหลายๆ ฝ่าย โดยเทคโนโลยีใหม่ที่เข้ามามีบทบาทนั้นนอกจากต้องมีศักยภาพในการผลิตแล้วควรมีกระบวนการผลิตที่สะอาดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมด้วย [1] ในปัจจุบันพลังงานรูปแบบใหม่ที่ได้รับการความสนใจคือเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuels) ซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดยปกติแล้วเชื้อเพลิงชีวภาพสามารถผลิตได้จากแหล่งพลังงานทดแทน ได้แก่ น้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ [2] ในปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจ ซึ่งสามารถผลิตน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า oleaginous microbe การใช้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ มีข้อดีคือ ลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก และสามารถใช้วัสดุเศษเหลือเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเชื้อเพลิงได้ [3] มีรายงานว่าการผลิตน้ำมันเพื่อใช้เป็นพลังงานจากจุลินทรีย์ทดแทนน้ำมันจากพืชเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ โดยน้ำมันที่ได้จากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบเรื่องชนิดและปริมาณกรดไขมัน เพราะชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่ได้

นั้นขึ้นอยู่กับสารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง [4] ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่า การเพาะเลี้ยงไม่ขึ้นกับสภาพอากาศและฤดูกาลเนื่องจากการเป็นภาชนะปิดที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ช่วยลดการแข่งขันการใช้น้ำมันเพื่อเป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงาน [5]

ปัจจุบันงานวิจัยเพื่อการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ศึกษาในยีสต์และสาหร่ายขนาดเล็ก [6] อย่างไรก็ตามแบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการนำมาผลิตน้ำมันเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน เนื่องจากแบคทีเรียเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว โดยแบคทีเรียที่เคยมีการรายงานว่าการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ ได้แก่ *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus* และ *Nocardia* [7] โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ ได้แก่ สารตั้งต้น เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของสารตั้งต้น อุณหภูมิ พีเอช เป็นต้น [1] ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TN1 ซึ่งคัดแยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และศึกษาสมบัติของน้ำมันที่ผลิตได้เพื่อประเมินศักยภาพของน้ำมันจากแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

- เชื้อแบคทีเรีย

Bacillus subtilis TN1 แยกได้จากตัวอย่างของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยทำการเก็บเชื้อไว้ในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่มีการเติมกลีเซอรอลร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส [8]

- อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient Agar (NA) และ Nutrient Broth (NB) โดยมีองค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร) คือ Beef extract 3; Peptone 5; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (สำหรับ Nutrient Agar เติมน้ำ Agar 15 กรัม)

Mineral Salt Medium (MSM) โดยมีองค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร) คือ KH_2PO_4 0.15; CaCl_2 0.15; MgCl_2 0.2; NaHCO_3 2.5; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.3; Yeast extract 10 และน้ำมันปาล์มร้อยละ 2 โดยน้ำหนักหรือน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ปรับ pH เท่ากับ 7.0 โดยใช้ 1 M HCl หรือ 1 M NaOH [9]

วิธีการทดลอง

2.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตรร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 4 องศาเซลเซียส) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของเชื้อและปรับความ

เข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ให้มีค่า OD_{660} เท่ากับ 0.5 [10]

ศึกษาภาวะที่เหมาะสม

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาคือ 1) แหล่งคาร์บอน (ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทราย และกากน้ำตาล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำมันปาล์มทางการค้า และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก) 2) ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (ร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 โดยน้ำหนักตามลำดับ) 3) แหล่งไนโตรเจน (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl ยูเรีย และเปปโตเนอ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก) 4) ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (ร้อยละ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.9 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ) 5) อัตราการเขย่า (0, 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที) 6) พีเอชเริ่มต้น (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ตามลำดับ) และ 7) ระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง (ทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง) นำมาวัดการเจริญค่าพีเอช และปริมาณกรดไขมัน เลือกช่วงเวลาที่ใช้ปริมาณน้ำมันมากที่สุด เพื่อใช้ในการเก็บเกี่ยวน้ำมันต่อไป

2.2 ศึกษาสมบัติของน้ำมันที่ผลิตได้เพื่อศึกษาศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ศึกษาสมบัติบางประการของน้ำมันที่สกัดได้ โดยศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมัน ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1 เก็บเกี่ยวเซลล์

แบบที่เรียโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย น้ำกลั่น 2 ครั้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดน้ำมันโดย วิธี Soxhlet extraction ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ นำ น้ำมันที่สกัดได้มาไฮโดรไลซ์กรดไขมันและเติมหมู่ เมธิลโดยเติมคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร และไดเอธิล อีเทอร์ 3 มิลลิลิตร ลงในน้ำมันและนำไประเหยที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 10% BF₃ 2 มิลลิลิตร และเมทานอล 1 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 45 นาที ทิ้งให้เย็นเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เฮกเซน 1 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งให้แยกชั้นและนำสารละลายชั้นบนไปวิเคราะห์ กรดไขมันด้วยเครื่อง Gas Chromatography กรด ไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์คิดเป็นร้อยละของกรด ไขมันทั้งหมด [11]

2.3 วิธีการวิเคราะห์

การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว รอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น ปลอดเชื้อ แล้วปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสออก นำตะกอน เซลล์ที่ได้ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16- 18 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง

การวัดค่าพีเอช

นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว รอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ค่าพีเอช ของสารละลายส่วนใสโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

การวิเคราะห์กรดไขมันโดยวิธีวัดสี Colorimetric method

นำตัวอย่างน้ำมันมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ชั่งเซลล์น้ำหนักเปียกมา 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร สกัดน้ำมันโดยการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอ ไรด์และสกัดน้ำมันออกจากเซลล์โดยการซาฟอนนิ ฟิเคชันด้วย 1.5 M KOH ในเอทานอลร้อยละ 80 โดยนำสารละลายเซลล์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดจุก เกลียว ขนาด 20 มิลลิลิตร เติม 1.5 M KOH ในเอทานอล ร้อยละ 80 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น ต้มให้ เดือดนาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลง เติม 2.5 M HCl ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และไอโซออกเทน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่า 200-300 ครั้ง/นาที เพื่อ สกัดไขมันอิสระออกมาอยู่ในชั้นของไอโซออกเทน เพื่อนำไปหาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธี Colorimetric method จากนั้นนำไปเทียบค่าปริมาณ กรดไขมันกับกราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติก [12]

3. ผลการวิจัย

3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและ การผลิตน้ำมันจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TN1

ผลของแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* TN1 สามารถเจริญได้ดีทั้งในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ มีการเจริญอยู่ในช่วง 1.05-3.51 กรัมต่อลิตร โดยเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อ ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำมัน และร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 0.08-0.24 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 5.70-8.30 โดยน้ำหนักแห้ง

ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีค่าสูงที่สุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนจึงเลือกใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *B. subtilis* TN1 ในขั้นตอนต่อไป

ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม

จากการทดลองพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มจากร้อยละ 1 เป็น 5 โดยน้ำหนักส่งผลให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจาก 2.75 เป็น 3.25 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นในช่วง 0.15-1.26 กรัมต่อลิตรและร้อยละ 5.45-38.77 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 2) การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มจากร้อยละ 5 เป็น 6 ไม่สามารถส่งผลให้ปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงเลือกใช้น้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันจากเชื้อจากเชื้อ *B. subtilis* TN1 ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันโดยเชื้อ *B. subtilis* TN1

C-source (2%, w/v)	DCW (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%)
Glucose	3.51±0.13 ^a	0.20±0.04 ^{bc}	5.70±1.02
Commercial sugar	3.06±0.07 ^b	0.18±0.01 ^c	5.88±0.39
Molasses	3.32±0.16 ^a	0.21±0.02 ^{ab}	6.33±0.67
Palm oil	2.89±0.07 ^c	0.24±0.03 ^a	8.31±1.24
Used palm oil	1.05±0.09 ^d	0.08±0.01 ^d	7.60±0.71
Control	0.17±0.02 ^e	0.00 ^e	0.00

* Different letters in the same column indicate significant different ($p<0.05$), Results represented mean $\pm$ standard deviation from triplicate determinations

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันโดยเชื้อ *B. subtilis* TN1

Palm oil (%, w/v)	DCW (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%)
1.0	2.75±0.10 ^d	0.15±0.02 ^d	5.45±0.78
2.0	2.89±0.07 ^c	0.24±0.03 ^c	8.31±1.24
3.0	2.96±0.07 ^b	0.46±0.02 ^b	15.53±0.90
4.0	3.13±0.08 ^a	0.94±0.09 ^b	29.95±3.62
5.0	3.25±0.05 ^a	1.26±0.09 ^a	38.65±2.08
6.0	3.47±0.07 ^a	1.29±0.05 ^a	37.29±1.75

* Different letters in the same column indicate significant different ($p<0.05$) Results represented mean $\pm$ standard deviation from triplicate determinations

ผลของแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* TN1 สามารถเจริญได้ดีทั้งในอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยมีการเจริญอยู่ในช่วง 3.06-4.97 กรัมต่อลิตร และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อใช้ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณน้ำมันที่ได้เท่ากับ 1.45 และ 1.26 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เปปโตน ยูเรีย และ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณน้ำมันที่ได้เท่ากับ 2.05 2.17 และ 2.54 กรัมต่อลิตร และ NaNO_3 ให้ร้อยละของน้ำมันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 50.99 ดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นจึงเลือกใช้ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *B. subtilis* TN1 ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันโดยเชื้อ *B. subtilis* TN1

N-source	DCW (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%)
Peptone	4.58±0.25 ^b	2.05±0.14 ^{bc}	44.84±0.99
Urea	4.92±0.14 ^a	2.17±0.02 ^c	44.19±1.11
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.06±0.07 ^c	1.45±0.09 ^b	47.25±2.00
NH ₄ Cl	3.25±0.05 ^d	1.26±0.09 ^b	38.65±2.08
NaNO ₃	4.97±0.19 ^e	2.54±0.13 ^a	50.99±1.17

* Different letters in the same column indicate significant different ($p < 0.05$), Results represented mean $\pm$ standard deviation from triplicate determinations

ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ NaNO₃ จากร้อยละ 0.1 เป็น 0.9 โดยน้ำหนัก ส่งผลให้ค่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* TN1 เพิ่มขึ้นจาก 2.05 เป็น 5.79 กรัมต่อลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของ NaNO₃ จากร้อยละ 0.1 เป็น 0.7 โดยน้ำหนัก ส่งผลให้ปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 0.85 เป็น 0.35 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 41.55 เป็น 58.15 ตามลำดับ การเพิ่มความเข้มข้นของ NaNO₃ จากร้อยละ 0.7 เป็น 0.9 โดยน้ำหนัก แสดงในตารางที่ 4 ดังนั้นจึงเลือกใช้ NaNO₃ ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนักเป็นความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *B. subtilis* TN1 ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้นของ NaNO₃ ต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TN1

NaNO ₃ (%)	DCW (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%)
0.1	2.05±0.12 ^e	0.85±0.04 ^d	41.55±4.20
0.3	3.28±0.09 ^d	1.43±0.03 ^c	43.57±1.01
0.5	4.97±0.19 ^c	2.54±0.13 ^s	50.99±1.17
0.7	5.76±0.20 ^b	3.35±0.13 ^a	58.15±1.99
0.9	5.79±0.22 ^a	3.30±0.10 ^a	57.01±2.38

* Different letters in the same column indicate significant different ($p < 0.05$), Results represented mean $\pm$ standard deviation from triplicate determinations

ผลของการเขย่าต่อการผลิตน้ำมัน

การเพิ่มความเร็วยรอบในการเขย่าจาก 50 เป็น 250 รอบต่อนาที ส่งผลให้ค่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* TN1 เพิ่มขึ้นจาก 0.25 เป็น 4.89 กรัมต่อลิตร การเพิ่มความเร็วยรอบในการเขย่าจาก 50 เป็น 200 รอบต่อนาที ส่งผลให้ปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 0.02 เป็น 3.35 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 8.06 เป็น 58.15 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเร็วยรอบในการเขย่าสูงกว่า 200 รอบต่อนาที ไม่ส่งผลให้ปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอีกทั้งยังทำให้ร้อยละของน้ำมันที่ผลิตลดลงอีกด้วย (ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเร็วในการเขย่าเร็วที่ 200 รอบต่อนาทีเป็นความเร็วยรอบในการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *B. subtilis* TN1 ในขั้นตอนต่อไป

ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตน้ำมัน

จากการทดลองพบว่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เชื้อ *B. subtilis* TN1 มีค่าการเจริญเติบโตสูงที่สุดที่ 5.76 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับค่าปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้ที่มีค่าเท่ากับ 3.35 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 58.15 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ รองลงมาคือที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 มีค่าการเจริญเติบโต ค่าปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้ที่มีค่าเท่ากับ 4.81, 2.50 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 51.87 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เป็นพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *B. subtilis* TN1 ในขั้นตอนต่อไปในการผลิตน้ำมันในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 5 ผลของความเร็วในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TN1

Shaking speed (rpm)	DCW (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%)
0	0.25±0.01 ^f	0.02±0.01 ^d	8.06±4.08
50	1.19±0.02 ^e	0.50±0.11 ^c	42.17±9.22
100	2.51±0.05 ^d	1.08±0.07 ^c	43.13±3.39
150	4.62±0.20 ^c	2.52±0.04 ^b	54.62±1.79
200	5.76±0.20 ^b	3.35±0.13 ^a	58.15±1.99
250	4.89±0.09 ^a	2.70±0.05 ^a	55.32±0.10

* Different letters in the same column indicate significant different ($p < 0.05$), Results represented mean $\pm$ standard deviation from triplicate determinations

ผลของระยะเวลา

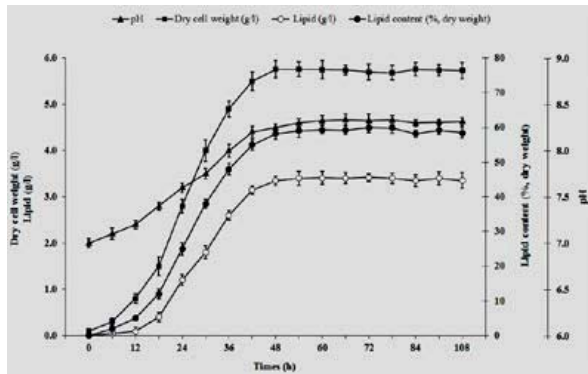
จากการทดลองพบว่าเชื้อ *B. subtilis* TN1 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 36 ชั่วโมงแรก

ของการเลี้ยง โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 5.76 กรัมต่อลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อัตราการเจริญเริ่มคงที่และลดลง สอดคล้องกับค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง และมีค่าสูงสุดที่ 8.40 หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 66 ชั่วโมง เชื้อ *B. subtilis* TN1 เริ่มผลิตน้ำมันหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงและมีค่ามากที่สุด 3.41 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 59 โดยน้ำหนัก ปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้ หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 1

ตารางที่ 6 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันโดยเชื้อ *B. subtilis* TN1

Initial pH	DCW (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%)
6.0	2.82±0.14 ^f	1.28±0.07 ^d	45.52±4.40
6.5	4.81±0.10 ^d	2.50±0.13 ^c	51.87±1.60
7.0	5.76±0.20 ^a	3.35±0.13 ^a	58.15±1.99
7.5	4.65±0.10 ^b	2.12±0.03 ^b	45.67±0.36
8.0	3.42±0.10 ^c	1.25±0.04 ^c	36.49±2.25

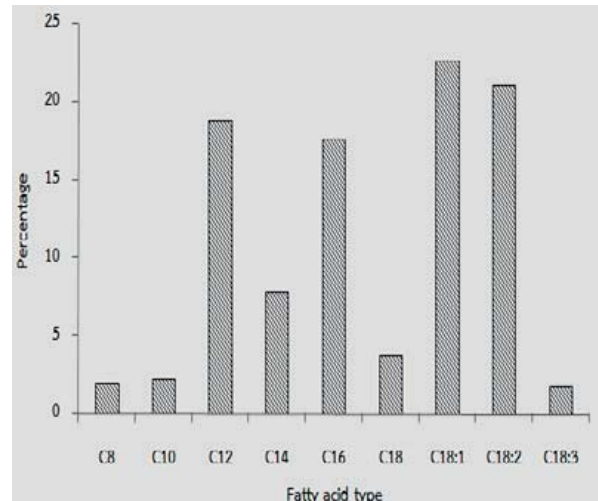
* Different letters in the same column indicate significant different ($p < 0.05$), Results represented mean $\pm$ standard deviation from triplicate determinations



รูปที่ 1 การเจริญเติบโต ค่าพีเอช ปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้โดยน้ำหนักแห้งจากเชื้อ *B. subtilis* TN1

3.2 ศึกษาสมบัติของน้ำมันที่ผลิตได้เพื่อศึกษาศักยภาพการผลิตไบโอดีเซล

รูปที่ 2 แสดงชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TN1 พบว่าประกอบด้วยกรดไขมันหลัก 4 ชนิดคือ กรดโอเลอิก (Oleic acid; C18:1) กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid; C18:2) กรดลอริก (Lauric acid; C12:0) และกรดปาล์มมิติก (Palmitic acid; C16:0) โดยมีปริมาณร้อยละ 22.6 21.0 18.8 และ 17.6 ตามลำดับ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบของน้ำมันพืช เช่น น้ำมันปาล์ม ซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ นอกจากนี้ยังพบกรดไมริสติก (Myristic acid; C14:0) กรดสเตียริก (Stearic acid; C18:0) กรดคาร์พิก (Capric acid; C10:0) กรดคาไพริก (Caprylic acid; C8:0) และกรดแอลฟาไลโนเลอิก (Alpha Linolenic acid; C18:3) โดยมีปริมาณร้อยละ 7.8, 3.7, 2.2, 2.0 และ 1.7 ตามลำดับ



รูปที่ 2 ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่พบในเชื้อ *B. subtilis* TN1 เมื่อเลี้ยงในภาวะเหมาะสม

4. การอภิปรายและวิจารณ์

ความสามารถในการผลิตน้ำมันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งของสารอาหาร สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงและประวัติของเชื้อแบคทีเรีย [13-14] โดยแหล่งคาร์บอนที่ดีซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างพลังงานและสะสมน้ำมันได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ไซโลส ซูโครส กลีเซอรอล เป็นต้น [15] นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนมีผลต่อปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่ผลิตโดยจุลินทรีย์แต่ละชนิด [16] เช่น รายงานของ Sriwongchai, et al [17] ศึกษาการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *Rhodococcus erythropolis* พบว่าการใช้กลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรทำให้เชื้อ *R. erythropolis* ผลิตน้ำมันได้สูงสุดที่ร้อยละ 14.1 โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่เชื้อ *orococcus* sp. สามารถเจริญและผลิตน้ำมันได้สูงสุด 6.8 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน [18] สำหรับการทดลองนี้พบว่าน้ำมันปาล์มมีความเหมาะสมที่สุดเนื่องจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TN1 คัดแยกได้จากตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันปาล์ม สอดคล้องกับรายงานของ Saisa-ard et al.

[10] ที่พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างที่ปนเปื้อนน้ำมันปาล์มจะสามารถใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพต่างๆ ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตน้ำมันจากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kurosawa et al. [19] ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *Rhodococcus opacus* PD630 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจาก 15 เป็น 35 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น 2 เท่า เช่นเดียวกับ Zhang et al. [20] ที่ศึกษาการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *Bacillus subtilis* HB1310 โดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยต้นสาลี โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งอาหาร พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนจาก 25 เป็น 50 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 2.24 เป็น 2.75 กรัมต่อลิตร สำหรับผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตน้ำมันพบว่า ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบไนโตรเจนไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนียหรืออัลคาไลน์อื่นๆ ออกมาทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Silva et al. [21] ที่ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 โดยมี glycerol ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและ NaNO_3 ร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 1.26-2.54 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 38.65-50.99 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยมีค่าสูงที่สุดเมื่อใช้ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน การเพิ่มความเข้มข้นของ NaNO_3 จากร้อยละ 0.1 เป็น 0.7 โดยน้ำหนัก ส่งผลให้ค่าปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น

แต่เมื่อความเข้มข้นของ NaNO_3 จากร้อยละ 0.7 เป็น 0.9 โดยน้ำหนัก ไม่ส่งผลให้ปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอีกทั้งยังทำให้ค่าร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้ลดลงเนื่องจากสัดส่วนระหว่างความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอยู่ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมส่งผลให้การผลิตน้ำมันลดลง [20] ความเร็วรอบของการเขย่ามีผลต่อปริมาณออกซิเจนในอาหาร พบว่าการเพิ่มความเร็วยิ่งขึ้นในการเขย่ามีแนวโน้มในการเพิ่มการเจริญและการผลิตน้ำมัน เพราะการให้อากาศเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอยสามารถดูดซึมออกซิเจนและสารอาหารเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น [22, 23] อย่างไรก็ตามการเขย่าที่เร็วเกินไปจะเป็นการรบกวนการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำมันลดลง เนื่องจากการสังเคราะห์น้ำมันจากปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์ต้องการปริมาณออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสม [24] จากการศึกษาผลของออกซิเจนต่อการผลิตน้ำมันโดย *Rhodotorula glutinis* เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าในภาวะที่มีออกซิเจนร้อยละ 25 ให้ปริมาณน้ำมันมากกว่าในภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนสูง (ร้อยละ 60) [25] นอกจากนี้จากรายงานของ Suh, et al. [26] ที่ศึกษาการผลิต 7, 10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic (DOD) จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PR3 พบว่าการเขย่าที่ความเร็วมากกว่า 200 รอบต่อนาที ส่งผลให้การเจริญและการผลิต DOD ลดลง ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารจะมีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยทั้งต่อการปริมาณและชนิดของกรดไขมัน ส่วนใหญ่ค่าพีเอชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะอยู่ในช่วง 5.4-8.5

ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ศึกษา [27] จากการทดลองพบว่าที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เชื้อ *B. subtilis* TN1 มีค่าการเจริญเติบโตสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับค่าปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้ เมื่อปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 8.0 พบว่าการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อ *B. subtilis* TN1 ลดลง เนื่องจากเป็นค่าพีเอชเริ่มต้นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* [28] สอดคล้องกับการศึกษาของ Ubalua [29] และ Owolabi, et al. [30] ที่ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* RD24 พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทั้งสองชนิดคือ 8.0 โดยการเจริญและการผลิตเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มค่าพีเอชสูงกว่านี้ นอกจากนี้ Desouky et al. [31] ทำการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสาร polyhydroxyalkanoates (PHA) จากเชื้อ *B. thuringiensis* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA เท่ากับ 7.5 พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยทั่วไปค่า พีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอชที่เป็นกลาง [32-34] การเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันของเชื้อ *B. subtilis* TN1 เป็นแบบ growth associated หรือ growth-linked [35] สอดคล้องกับการทดลองของ Da Silva, et al. [36] ที่ศึกษาการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *Alcanivorax borkumensis* SK2 โดยใช้น้ำเสียที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์เป็นองค์ประกอบพบว่าเชื้อ *A. borkumensis* SK2

สามารถผลิตน้ำมันได้มากที่สุด 15 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยเชื้อ *A. borkumensis* SK2 มีการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันในรูปแบบ growth-linked ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TN1 มีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบของน้ำมันพืช เช่น น้ำมันปาล์ม ซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ นอกจากนี้ยังพบกรดไมริสติก กรดสเตียริก กรดคาร์พิก กรดคาไพโรลิก และกรดแอลฟาโอเลอิก สอดคล้องกับรายงานของ Shruthi et al. [37] ที่ศึกษาการผลิตน้ำมันจากเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนพบว่าองค์ประกอบของน้ำมันที่แยกได้จากเชื้อแบคทีเรียมีกรดสเตียริก กรดไมริสติกและกรด ลอริกเป็นองค์ประกอบหลัก โดยน้ำมันที่สกัดได้มีสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

5. บทสรุป

ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *B. subtilis* TN1 คือการเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มและโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 0.7 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ พีเอช เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) เชื้อ *B. subtilis* TN1 มีปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 5.76 กรัมต่อลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และมีค่าปริมาณน้ำมันและร้อยละของน้ำมันที่ผลิตได้มากที่สุด 3.41 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 59 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้พบว่าประกอบด้วยกรดไขมันที่สำคัญ 4 ชนิดคือ กรดโอเลอิก กรดลิโน

เลอิก กรดลอริก และกรดปาล์มมิติก โดยมีปริมาณร้อยละ 22.6 21.0 18.8 และ 17.6 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันพืช จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TN1 มีศักยภาพในการนำมาผลิตน้ำมันเซลล์เดียวเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลและสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคตได้

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานีและมหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

7. รายการอ้างอิง

- [1] Qadeer S, Khalid A, Mahmood S, Anjum M. Utilizing oleaginous bacteria and fungi for cleaner energy production. J Clean Prod. 2017; 168:917-928.
- [2] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: biochemistry of single cell oil production. Eur J Lipid Sci Technol. 2011; 113:1031-1051.
- [3] Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renew Energy. 2009; 34:1-5.
- [4] Leiva-Candia DE, Pinzi S, Redel-Mac'ias MD, Koutinas A, Webb C, Dorado MP. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. Fuel. 2014; 123:33-42.
- [5] Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, Levin, D, Block DE, German JB, et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. Biotechnol Adv. 2014; 32:1336-1360.
- [6] Sharma KK, Schuhmann H, Schenk PM. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. Energies. 2012; 5: 1532-1553.
- [7] Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, Hu Z, Schirmer A, McClure A, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. Nature. 2010; 463: 559-562.
- [8] Binazadeh M, Karimi IA, Li Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. Enzyme Microb Technol. 2009; 45:195-202.
- [9] Katayama T, Kanno M, Morita N, Hori T, Narihiro T, Mitani Y, et al. An oleaginous bacterium that intrinsically accumulates long-chain free fatty acids in its cytoplasm. Appl Environ Microbiol. 2014; 80:1126-1131.
- [10] Saisard K, Saimmai A, Maneerat S. Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil

- contaminated soils. Songklanakarin J Sci Technol. 2014; 36:163-175.
- [11] Demirbas A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. Energy Convers Manag. 2008; 49(1):125-130.
- [12] Kwon DY, Rhee JS. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. J Am Oil Chem Soc. 1986; 63:89-92.
- [13] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renew Sust Energ Rev. 2010; 14: 557-577.
- [14] Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renew Sust Energ Rev. 2010; 14: 217-232.
- [15] Shimizu S, Kawashima H, Shinmen Y, Akimoto K, Yamada H. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. J Am Oil Chem Soc 1988; 65:1455-1459.
- [16] Gill CO, Hall M, Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-state continuous culture. Appl Environ Microbiol. 1997; 33:231-239.
- [17] Sriwongchai S, Pokethitiyook P, Pugkaew W, Kruatrachue M, Lee H. Optimization of lipid production in the oleaginous bacterium *Rhodococcus erythropolis* growing on glycerol as the sole carbon source. Afr J Biotechnol. 2012; 11:14440-14447.
- [18] Santala S, Efimova E, Kivinen V, Larjo A, Aho T, Karp M, Santala V. Improved triacylglycerol production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 by metabolic engineering. Microb Cell Fact. 2011; 10:36.
- [19] Kurosawa K, Boccazzi P, de Almeida NM, Sinskey AJ. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production. J Biotechnol. 2010; 147:212-218.
- [20] Zhang Q, Li Y, Xia L. An oleaginous endophyte *Bacillus subtilis* HB1310 isolated from thin-shelled walnut and its utilization of cotton stalk hydrolysate for lipid production. Biotechnol Biofuels. 2014; 7:152.
- [21] Silva SN, Farias CB, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. Colloids Surf B: Biointerfaces. 2010; 1:174-183.
- [22] Cameotra SS, Makkar RS. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions.

- Appl Microbiol Biotechnol. 1998; 50:520-529.
- [23] Fonseca C, Isabel SM, Barbel HH. L-arabinose metabolism in *Candida arabinofementans* PYCC 5603T and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. Appl Microbiol Biotechnol. 2007; 3:303-310.
- [24] Rintala E. Effects of oxygen provision on the physiology of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Faculty of Biological and Environmental Sciences. Department of Biosciences Division of General Microbiology. University of Helsinki, Finland. 2010.
- [25] Yen HW. Zhang Z. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. J Biosci Bioeng. 2011; 112:71-74.
- [26] Suh MJ, Baek KY, Kim BS, Hou CT, Kim HR. Production of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from olive oil by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 89:1721-1727.
- [27] Johnson V, Singh M, Saini VS, Sista VR, Yadav NK. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. World J Microbiol Biotechnol. 1992; 8:382-384.
- [28] Beales N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2004; 3; 1-20.
- [29] Ubalua AO. The use of corn starch for growth and production of α -amylase from *Bacillus subtilis*. J Microbiol Res. 2014; 4(4): 153-160.
- [30] Owolabi OO, Kolawole BM, Olusanjo AI, Olaoluwa O. Molecular identification and amylolytic potential of a thermophilic bacteria species from refuse dump in Ile-Ife, Nigeria. Int Journal of Biological Research,. 2014;2(2): 134-139.
- [31] Desouky SE, Shiekh HH., Elabd MA. Shehab, AM. Screening, optimization and extraction of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Bacillus thuringiensis*. J Adv Biol Biotechnol. 2014; 1(1):40-54
- [32] Cooper DG, Goldenberg BG. Surface-active agents from two *Bacillus* species. Appl Environ Microbiol. 1987; 53:224-229.
- [33] Abu-Ruwaida AS, Banat M, Haditirto S, Salem, S, Kadri A. Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization and evaluation. Acta Biotechnol. 1991; 11(4):315-324.

- [34] Robbins JA, Levy R. A review of the microbial degradation of fuel. In ed. Paulus, W. Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook, Springer Netherlands. 2004; pp. 177-201.
- [35] Giudice AL, Casella P, Caruso C, Mangano S, Bruni V, De Domenico M, Michaud L. Occurrence and characterization of psychrotolerant hydrocarbon-oxidizing bacteria from surface seawater along the Victoria Land coast (Antarctica). Polar Biol. 2010; 33:929-943.
- [36] Da Silva PD, Lima F, Alves MM, Bijmans MF, Pereira MA. Valorization of lubricant-based wastewater for bacterial neutral lipids production: growth-linked biosynthesis. Water Res. 2016; 101:17-24.
- [37] Shruthi P, Rajeshwari T, Mrunalini BR, Girish V, Girisha ST. Evaluation of oleaginous bacteria for potential biofuel. Int J Curr Microbiol Appl. 2014; 3:47-57.