

การคัดกรองอีสต์ผลิตน้ำมันและการหาภาวะเหมาะสมที่สุดของการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบ
อ้อย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING OF OIL PRODUCING YEAST AND OPTIMIZATION OF OIL PRODUCTION FROM
SUGARCANE LEAVES HYDROLYSATE



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองยีสต์ผลิตน้ำมันและการหาภาวะเหมาะสมที่สุดของการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบอ้อย
โดย	น.ส.พัชราภรณ์ หุ่นดี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริตา สวารช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริตา สวารช)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาติา จันทร์ประทีป นภาธร)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)	

พัชรารณณ์ ทุ่งดี : การคัดกรองยีสต์ผลิตน้ำมันและการหาภาวะเหมาะสมที่สุดของการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบอ้อย . (SCREENING OF OIL PRODUCING YEAST AND OPTIMIZATION OF OIL PRODUCTION FROM SUGARCANE LEAVES HYDROLYSATE) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร. อัญชริดา สวารชช, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

ยีสต์ 223 ไฮโดรไลเสต ที่คัดแยกได้จาก 223 ตัวอย่าง ที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ 9 แห่งในประเทศไทย ถูกนำมาคัดกรองยีสต์ที่สะสมน้ำมันในเซลล์สูง การคัดกรองเบื้องต้นโดยการย้อมเซลล์ด้วยสีไนล์เรด พบว่ามียีสต์ 16 สายพันธุ์ที่มีขนาดหยดน้ำมันภายในเซลล์ใหญ่กว่าครึ่งหนึ่งของขนาดเซลล์ ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันสะสมภายในเซลล์ยีสต์เหล่านี้โดยเลี้ยงในอาหารผลิตน้ำมันที่ทราบองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งมีกลูโคส 50 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน พบว่า *Papiliotrema laurentii* N-16.2, *Rhodotorula* (Rh.) *sphaerocarpa* 11-14.4, *Saitozyma* (Sait.) *podzolica* 11-11.3.1 และ *Sait. podzolica* N-8.4 เป็นยีสต์อุดมไขมัน การศึกษาการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตใบอ้อย (sugarcane leaves hydrolysate, SLH) ของยีสต์อุดมไขมันที่คัดกรองได้ พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตใบอ้อย โดย *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด (0.98 กรัม/ลิตร) การหาภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ในไฮโดรไลเสตใบอ้อย พบว่าเมื่อใช้กลูโคสที่เลี้ยงใน SLH ที่ผ่านการปรับต่างเกิน (overtiming) (6% -DSLH) ที่เติมสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 3 กรัม/ลิตร และเพปไทน์ 3 กรัม/ลิตร และผลิตน้ำมันใน 12%-SLH (อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน เท่ากับ 24) ที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน ที่ภาวะดังกล่าวนี้ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 1.65 กรัม/ลิตร (อัตราการผลิตน้ำมัน 0.41 กรัม/ลิตร/วัน) น้ำมันที่ผลิตมีองค์ประกอบกรดไขมันชนิดหลักเป็นกรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติก ค่าความหนืด ความถ่วงจำเพาะ เลขซีเทน และเลขไอโอดีน ซึ่งคำนวณจากปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันทำนายว่าไบโอดีเซลที่ผลิตมีคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนดของสหรัฐอเมริกาและยุโรปและใกล้เคียงกับไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันของพืช แสดงว่าน้ำมันยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีศักยภาพเป็นน้ำมันทางเลือกสำหรับนำมาผลิตไบโอดีเซล นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังหาภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera* (Cy.) *subsucciciens* NG8.2 ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าน้ำมันที่ผลิตมีปริมาณกรดปาล์มิตอเลอิกสูงจากไฮโดรไลเสตใบอ้อย กรดปาล์มิตอเลอิกเป็นกรดไขมันราคาแพง มีประโยชน์ด้านการแพทย์และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cy. subsucciciens* NG8.2 คือใช้ SLH ที่ผ่านการปรับต่างเกิน เพื่อกำจัดฟอสเฟต (12% -DSLH) (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เท่ากับ 21,182) เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร พีเอช 5.5 และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน ที่ภาวะดังกล่าวนี้ *Cy. subsucciciens* NG8.2 ให้ผลผลิตน้ำมันและปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.59 กรัม/ลิตร และ 14.86% น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ น้ำมันที่ผลิตมีปริมาณกรดปาล์มิตอเลอิก 15.80% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ผลผลิตกรดปาล์มิตอเลอิกเท่ากับ 2.09 มิลลิกรัม/กรัมใบอ้อยแห้ง และพบว่า *Cy. subsucciciens* NG8.2 ผลิตน้ำมันใน 12%-DSLH ได้มากกว่าใน 12%-SLH แต่น้ำมันของ *Cy. subsucciciens* NG8.2 ที่ผลิตใน 12%-DSLH มีปริมาณกรดปาล์มิตอเลอิกต่ำกว่าในน้ำมันที่ผลิตใน 12%-SLH การเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตลงใน 12%-DSLH ทำให้น้ำมัน *Cy. subsucciciens* NG8.2 ที่ผลิตมีปริมาณกรดปาล์มิตอเลอิกสูงขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ Mg^{2+} ต่อปริมาณของกรดปาล์มิตอเลอิกในน้ำมันของ *Cy. subsucciciens* NG8.2 ที่ผลิตในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ผ่านการปรับต่างเกิน

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5872821923 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORD: Oleaginous yeast, Yeast oil, Sugarcane leaves hydrolysate, *Rhodotorula sphaerocarpa*, *Cyberlindnera subsufficiens*

Patcharaporn Hoondae : SCREENING OF OIL PRODUCING YEAST AND OPTIMIZATION OF OIL PRODUCTION FROM SUGARCANE LEAVES HYDROLYSATE . Advisor: Prof. ANCHARIDA SAVARAJARA, D.Eng. Co-advisor: Prof. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D.

A total of 223 yeasts were isolated from 223 samples collected from 9 natural sources in Thailand. Intracellular oil accumulated of the isolated yeasts was evaluated to screen for high oil producing yeast. Preliminary screening by Nile red staining revealed that 16 strains contained oil droplet bigger than half of cell size. Analysis of intracellular oil accumulated of the 16 strains using synthetic oil production medium containing 50 g/L glucose and incubation at 30°C, 200 rpm for 6 days found that *Papiliotrema laurentii* N-16.2, *Rhodotorula (Rh.) sphaerocarpa* 11-14.4, *Saitozyma (Sait.) podzolica* 11-11.3.1 and *Sait. podzolica* N-8.4 were designated as oleaginous strains. An investigation for their capability to produce oil in sugarcane leaves hydrolysate (SLH) revealed that all of them could produce oil in the SLH and the *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 gave the highest oil yield (0.98 g/L). Optimization condition for the *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 oil production in the SLH was culturing inoculum in overlimed SLH (6%-DSLH) supplemented with 3 g/L yeast extract and 3 g/L peptone, producing the oil in 12%-SLH (carbon to nitrogen ratio of 24) supplemented with 5 g/L KH_2PO_4 , pH 4.5 and incubating at 30°C, 200 rpm for 4 days. At the optimized condition, the *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 gave the highest oil yield of 1.65 g/L (oil productivity of 0.41 g/L/day). The oil produced had oleic acid and palmitic acid as major fatty acids. Values of viscosity, specific gravity, cetane number and iodine number calculated from fatty acid content of the oil predicted that quality of biodiesel produced met both the US and EU standard specifications and similar to those produced from plant oils. This result indicated that *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 oil was promising alternative oil feedstock for biodiesel production. Moreover, optimal condition for production of *Cyberlindnera (Cy.) subsufficiens* NG8.2 oil which has previously been reported to contain high palmitoleic acid content from sugarcane leaves hydrolysate was also determined in this study. Palmitoleic acid (C16:1) or omega7 is a high value fatty acid. It had several applications in medicine and cosmetic industries. The optimal condition for the *Cy. subsufficiens* NG8.2 oil production was overlimed SLH (12%-DSLH) (carbon to phosphorus ratio of 21,182) supplemented with 0.75 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5.5 and incubation at 30°C, 200 rpm for 4 days. Under the optimal condition, the *Cy. subsufficiens* NG8.2 gave the highest oil yield (1.59 g/L), oil content (14.86%, w/w DCW) and palmitoleic acid content of the oil was 15.80% (w/w). Palmitoleic acid yield obtained was 2.09 mg/g DW sugarcane leaves. It was found that the *Cy. subsufficiens* NG8.2 produced oil in 12%-DSLH higher than 12%-SLH, but the oil produced in the 12%-DSLH contained lower palmitoleic acid than those produced in 12%-SLH. The addition of $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ into the 12%-DSLH increased palmitoleic acid content of the oil produced. The result indicated an importance of Mg^{2+} on palmitoleic acid content of the *Cy. subsufficiens* NG8.2 oil produced in overlimed SLH.

Field of Study: Microbiology and Microbial Technology Student's Signature

Academic Year: 2020 Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้แล้วเสร็จสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยความกรุณาและการช่วยเหลือจาก ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริตา สวารชร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาคำแนะนำ ข้อชี้แนะ และ กำลังใจแก่ผู้วิจัย ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม ศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อชี้แนะ ตลอดจนการสนับสนุนสารเคมีและเครื่องมือในการทำวิจัย

กราบขอบพระคุณ รศ. ดร. ชูลี ยมภักดี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. สุชาติดา จันทร์ประทีป นภاطر รศ. ปาหนัน เรืองสำราญ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ รศ. ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำเพื่อแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและทุนอุดหนุนการวิจัยแก่ ผู้วิจัย ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย จากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และ ขอขอบคุณศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคที่ 3 (ศอภ. 3) อำเภอบางพระ จังหวัดชลบุรี ที่ อนุเคราะห์ไปอ้อยสำหรับใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง สมาชิกห้องวิจัย A.S. 1804/15 และภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ตลอดจนพี่ๆ เจ้าหน้าที่บุคลากรทุกท่านของภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้การสนับสนุนทั้งร่างกาย แรงใจ ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยจะไม่สามารถประสบความสำเร็จในการเรียนระดับปริญญาเอกและการทำวิจัยได้หากขาด การสนับสนุนจากคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวทุกคนที่ให้ความรัก กำลังใจ ให้การสนับสนุน และให้ความช่วยเหลือใน ทุกๆ ด้าน จึงขอกราบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

พัชราภรณ์ หุ่นดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 แนวคิด ทฤษฎีที่สำคัญ และสมมุติฐาน	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	5
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัยนี้	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	6
2.1 ยีสต์อุดมไขมัน.....	6
2.2.1 ไขมัน (lipid)	10
2.2.2 กรดไขมัน (fatty acid).....	11
2.3 การสังเคราะห์และสะสมไขมันของยีสต์อุดมไขมัน	15
2.3.1 วิธีการสังเคราะห์และสะสมไขมันของยีสต์อุดมไขมันภายใต้ภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด	15
2.3.2 วิธีการสังเคราะห์และสะสมไขมันของยีสต์อุดมไขมันภายใต้ภาวะที่มีฟอสฟอรัสจำกัด	18
2.4 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไขมันของยีสต์อุดมไขมัน	19
2.4.1 อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน	19

2.4.2	ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน	20
2.4.3	ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน	22
2.4.4	แร่ธาตุและวิตามิน	22
2.4.5	ฟิเอย	23
2.4.6	อุณหภูมิ.....	24
2.4.7	การให้อากาศ.....	25
2.5	ลิกโนเซลลูโลสและการเตรียมไฮโดรไลเสต.....	25
2.5.1	ลิกโนเซลลูโลสและการผลิตน้ำมันยีสต์.....	25
2.5.2	การเตรียมไฮโดรไลเสต	32
2.6	ไบอ้อย	41
2.7	สมบัติของไบโอดีเซลจากไขมันและน้ำมัน	42
บทที่ 3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	46
3.1	ยีสต์.....	46
3.2	ไบอ้อย	46
3.3	อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	46
3.4	สารเคมี.....	49
3.5	วิธีการ.....	51
3.5.1	คัดแยกยีสต์	51
3.5.2	จัดกลุ่มและการพิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์ที่คัดแยกได้	64
3.5.2.1	สกัดดีเอ็นเอ	64
3.5.2.2	จัดกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) โดยเทคนิค repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR).....	65
3.5.2.3	ระบุชนิดของยีสต์ด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ ยีน 26S rRNA.....	66

3.5.3	คัดกรองยีสต์อุณหภูมุน้ำมัน	67
3.5.3.1	คัดกรองเบื้องต้น	67
3.5.3.2	ผลิตน้ำมันเซลล์ยีสต์	68
3.5.3.3	วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์	68
3.5.4	ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการของยีสต์อุณหภูมุน้ำมันที่คัดกรองได้	69
3.5.5	คัดเลือกยีสต์อุณหภูมุน้ำมันที่สามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักในไฮโดรไลเสตจากกลีโคซิลโลสเพื่อการเจริญ	69
3.5.6	เตรียมไฮโดรไลเสตใบอ้อย	69
3.5.6.1	เตรียมตัวอย่างใบอ้อย	69
3.5.6.2	เตรียมไฮโดรไลเสตใบอ้อย	70
3.5.6.3	กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ในไฮโดรไลเสตใบอ้อยโดยวิธีปรับต่างเกิน (overliming)	70
3.5.6.4	วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตใบอ้อย	72
3.5.7	ผลิตน้ำมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตใบอ้อย	72
3.5.7.1	ขั้นแรกหรือขั้นเจริญ (growth stage) ในอาหารไฮโดรไลเสตใบอ้อย	72
3.5.7.2	ขั้นที่สองหรือขั้นผลิตน้ำมัน (oil production stage) ในอาหารไฮโดรไลเสตใบอ้อย	72
3.5.8	หาภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตใบอ้อยของยีสต์อุณหภูมุน้ำมันสายพันธุ์ที่ผลิตน้ำมันได้สูงที่สุดจากข้อ 3.5.7	73
3.5.9	หาภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตใบอ้อยของยีสต์อุณหภูมุน้ำมัน <i>Cy. subsufficiens</i> NG8.2	74
3.5.10	วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ	75
3.5.11	วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้	75
3.5.12	คำนวณค่าสมบัติไอโอดีเซลของน้ำมันยีสต์ที่ผลิตได้	75
บทที่ 4	ผลการทดลองและอภิปรายผล	77

4.1 ผลการคัดแยกยีสต์.....	77
4.2 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้	86
4.3 ผลการคัดกรองยีสต์อุดมน้ำมัน	99
4.4 ผลการคัดเลือกยีสต์อุดมน้ำมันที่สามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักของไฮโดรไลเสตจากลิกโนเซลลูโลสเพื่อการเจริญได้.....	104
4.5 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์อุดมน้ำมันที่คัดกรองได้.....	104
4.5.1 <i>Papiliotrema laurentii</i> N-16.2.....	104
4.5.2 <i>Rhodotorula sphaerocarpa</i> 11-14.4.....	105
4.5.3 <i>Saitozyma podzolica</i> 11-11.3.1 และ <i>Sait. podzolica</i> N-8.4.....	105
4.6 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมัน.....	109
4.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไบอ้อยและของไฮโดรไลเสตไบอ้อย.....	111
4.8 ผลการคัดเลือกยีสต์อุดมน้ำมันที่สามารถผลิตน้ำมันใน 12%-SLH.....	113
4.9 ผลการหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตน้ำมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตไบอ้อย.....	115
4.9.1 <i>Rhodotorula sphaerocarpa</i> 11-14.4.....	115
4.9.1.1 ผลการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับด่าง.....	115
4.9.1.2 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อการผลิตน้ำมันของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 ใน 12%-SLH และ 12%-DSLH เมื่อใช้กล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร 6%-DSLH.....	117
4.9.1.3 ผลของอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 ใน 12%-SLH.....	120
4.9.1.4 ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเป็น 24 และ 60 เมื่อแปรผันระยะเวลาเพาะเลี้ยง.....	122
4.9.1.5 ผลของฟอสฟอรัสต่อการผลิตน้ำมันของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 ใน 12%-SLH.....	123

4.9.1.6 ผลของโลหะไอออนต่อการผลิตน้ำมันของ Rh. sphaerocarpa 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร	125
4.9.1.7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของ Rh. sphaerocarpa 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร	127
4.9.1.8 ผลการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของ Rh. sphaerocarpa 11-14.4	130
4.9.1.9 ค่าสมบัติเชิงทำนายของไบโอดีเซลที่จะผลิตได้จากน้ำมัน Rh. sphaerocarpa 11-14.4 ที่ผลิตภายใต้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.9.1.7	132
4.9.2 <i>Cyberlindnera subsufficiens</i> NG8.2	136
4.9.2.1 ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของ Cy. subsufficiens NG8.2 ใน 12%-SLH และ 12%-SLH ที่ผ่านการปรับต่างเกิน (12%-DSLH)	136
4.9.2.2 ผลการหาอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมัน Cy. subsufficiens NG8.2 ใน 12%-DSLH	137
4.9.2.3 ผลของแมกนีเซียมต่อการผลิตน้ำมันของ Cy. subsufficiens NG8.2 ใน 12%-DSLH	140
4.9.2.4 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของ Cy. subsufficiens NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต 0.75 กรัม/ลิตร	142
4.9.2.5 ผลการเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของ Cy. subsufficiens NG8.2 ในไฮโดรไลเสตไบอ้อยชนิดต่าง ๆ	145
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	148
บรรณานุกรม	151
ภาคผนวก	173
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	174
ภาคผนวก ข สารเคมี	178
ภาคผนวก ค ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้	180
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรมของกาแล็กโตส อะราบีโนส และเซลโลไบโอส	190

ภาคผนวก จ กราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรมของเฟอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF).....	195
ภาคผนวก ฉ โครมาโทแกรมของกรดไขมันจากการวิเคราะห์ด้วย GC	199
ประวัติผู้เขียน	203



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	การผลิตน้ำมันยีสต์ของยีสต์อุณหภูมุน้ำมันในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ	9
ตารางที่ 2.2	ปริมาณกรดไขมันหลักที่พบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์อุณหภูมุน้ำมันบางชนิด	13
ตารางที่ 2.3	โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันหลักที่พบได้ในน้ำมันของยีสต์อุณหภูมุน้ำมัน	14
ตารางที่ 2.4	ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในลิกโนเซลลูโลสชนิดต่าง ๆ	28
ตารางที่ 2.5	การผลิตน้ำมันยีสต์โดยใช้ไฮโดรไลเสตลิกโนเซลลูโลสเป็นสับสเตรต	33
ตารางที่ 3.1	ที่ตั้งและพิกัดของแหล่งเก็บตัวอย่าง	52
ตารางที่ 3.2	ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี	53
ตารางที่ 3.3	ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด	54
ตารางที่ 3.4	ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี	55
ตารางที่ 3.5	ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม	56
ตารางที่ 3.6	ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง	57
ตารางที่ 3.7	ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด	59
ตารางที่ 3.8	ข้อมูลตัวอย่างพื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง	60
ตารางที่ 3.9	ข้อมูลตัวอย่างน้ำตกหวาย จังหวัดระยอง	61
ตารางที่ 3.10	ข้อมูลตัวอย่างจากวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	62
ตารางที่ 3.11	ปัจจัย และค่าระดับของปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman	74
ตารางที่ 4.1	จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี	78
ตารางที่ 4.2	จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด	78
ตารางที่ 4.3	จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี	79

ตารางที่ 4.4 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม.....	80
ตารางที่ 4.5 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง.....	81
ตารางที่ 4.6 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด.....	82
ตารางที่ 4.7 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากพื้นที่สงวนชีวมณฑล จังหวัดระนอง.....	83
ตารางที่ 4.8 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จังหวัดระนอง.....	84
ตารางที่ 4.9 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์.....	84
ตารางที่ 4.10 ผลการย้อมสีไนลเรดเพื่อดูขนาดหยดน้ำมันในเซลล์ยีสต์	101
ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันสะสมภายในเซลล์	103
ตารางที่ 4.12 องค์ประกอบทางเคมีของไบอ้อย	112
ตารางที่ 4.13 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตไบอ้อย	112
ตารางที่ 4.14 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 เมื่อเติมโลหะไอออนลงใน 12%-SLH ที่มีโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 5 กรัม/ลิตร.....	126
ตารางที่ 4.15 ค่าผลกระทบปัจจัยต่าง ๆ ต่อการผลิตน้ำมันของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 เมื่อเติมโลหะไอออนลงใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 5 กรัม/ลิตร	127
ตารางที่ 4.16 ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 เมื่อเจริญใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5	131
ตารางที่ 4.17 ค่าสมบัติต่าง ๆ ของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 เปรียบเทียบกับไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันสายพันธุ์อื่น ๆ น้ำมันปาล์ม น้ำมันเรพซีด น้ำมันสบู่ดำ น้ำมันถั่วเหลือง และมาตรฐานไบโอดีเซล	134

ตารางที่ 4.18 เปรียบเทียบชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ <i>Cy. subsufficiens</i> NG8.2 เมื่อเจริญใน 12%-SLH, 12%-DSLH และ 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต ปริมาณ 0.75 กรัม/ ลิเอซ 5.5.....	147
ตารางที่ ค.1 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี 180	
ตารางที่ ค.2 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด.....	181
ตารางที่ ค.3 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี.....	182
ตารางที่ ค.4 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม.....	183
ตารางที่ ค.5 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง.....	184
ตารางที่ ค.6 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด.....	186
ตารางที่ ค.7 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง.....	187
ตารางที่ ค.8 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จังหวัดระนอง.....	188
ตารางที่ ค.9 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์.....	189

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 หยदनํ้ามันในเซลล์ <i>Y. lipolytica</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Thevenieau และ Nicaud, 2013).....	8
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของ triacylglycerol (TAG) และ diacylglycerol (DAG) R1, R2 และ R3 แทนกรดไขมัน (Yanai และคณะ, 2007).....	11
ภาพที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์และสะสมนํ้ามันของยีสต์อุดมนํ้ามันในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Qin และคณะ, 2017).....	16
ภาพที่ 2.4 กลไกการสังเคราะห์กรดไขมัน (Balan, 2019).....	17
ภาพที่ 2.5 การสร้างหยदनํ้ามัน (Alberts และคณะ, 2008).....	18
ภาพที่ 2.6 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันในภาวะที่มีฟอสเฟตจำกัด (Wang และคณะ, 2018b).....	19
ภาพที่ 2.7 โครงสร้างลิแกโนเซลลูโลสในเซลล์พืช (Bamdad และคณะ, 2018).....	27
ภาพที่ 2.8 ลักษณะการจัดเรียงตัวของสายโพลีเมอร์นํ้าตาลกลูโคสในเซลลูโลส (Jedvert และ Heinze, 2017).....	28
ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของเซลโลไบโอส (Ouellette และ Rawn, 2015).....	29
ภาพที่ 2.10 โครงสร้างและรูปแบบการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลนํ้าตาลกลูโคสภายในสายพอลิเมอร์ (เส้นจุดไปปลา) และระหว่างสายพอลิเมอร์ของเซลลูโลส (เส้นประ) (Festucci-Buselli และคณะ, 2007).....	29
ภาพที่ 2.11 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Machmudah และคณะ, 2017).....	30
ภาพที่ 2.12 องค์ประกอบพื้นฐานของลิกนิน I: p-coumaryl alcohol; II: coniferyl alcohol; III: sinapyl alcohol (Huang และคณะ, 2019).....	31
ภาพที่ 2.13 องค์ประกอบของลิแกโนเซลลูโลสและผลของการปรับสภาพ (Ji และคณะ, 2011).....	35
ภาพที่ 2.14 ผลิตผลพลอยได้ จากการปรับสภาพลิแกโนเซลลูโลส (ดัดแปลงจาก Patel และคณะ (2016)).....	37
ภาพที่ 2.15 ปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (Patel และ Shah, 2015).....	43

ภาพที่ 3.1 ภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการจัดกลุ่มยีสต์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR).....	66
ภาพที่ 3.2 ภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของยีน 26S rRNA.....	67
ภาพที่ 3.3 อนุภาคใบอ้อยขนาด 20-40 เมช	70
ภาพที่ 3.4 แผนผังแสดงวิธีเตรียมไฮโดรไลเสตใบอ้อย	71
ภาพที่ 4.1 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี.....	86
ภาพที่ 4.2 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด	87
ภาพที่ 4.3 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี.....	88
ภาพที่ 4.4 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม.....	89
ภาพที่ 4.5 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง	90
ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด.....	91
ภาพที่ 4.7 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากพื้นที่สงวน ชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง	92
ภาพที่ 4.8 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติ น้ำตกหงาว จังหวัดระนอง	93
ภาพที่ 4.9 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากวนอุทยาน ปราณบุรีจังหวัดประจวบคีรีขันธ์	94
ภาพที่ 4.10 ค่าร้อยละความชุกสัมพันธ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลนแต่ละแหล่ง (MRDS No. 2, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2; MRDS No. 4, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4; MRDS No. 6, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6; MRDS No. 7, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชาย	

เลนที่ 7; MRDS No. 11, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11; MRDS No. 45, สถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45; RBR, พื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง; NNF, อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว; PNFP, วนอุทยานปราณบุรี).....	95
ภาพที่ 4.11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของยีสต์อุดมไขมัน 4 สายพันธุ์ ก) <i>Pap. laurentii</i> N-16.2 เจริญบนอาหารแข็ง 5% MEA ข) <i>Rh. sphaerocarpa</i> (11-14.4) เจริญบนอาหารแข็ง 5% MEA ค) <i>Sait. podzolica</i> 11-11-3.1 เจริญบนอาหารแข็ง YMA ง) <i>Sait. podzolica</i> N-8.4 เจริญบนอาหารแข็ง YMA แถบมาตราส่วน (scale bar) เท่ากับ 10 ไมโครเมตร.....	106
ภาพที่ 4.12 Dalmau slide culture ของยีสต์อุดมไขมัน 4 สายพันธุ์ ก) <i>Pap. laurentii</i> N-16.2 เจริญบนอาหาร YMA ข) <i>Rh. sphaerocarpa</i> (11-14.4) เจริญบนอาหาร corn meal agar ค) <i>Sait. podzolica</i> 11-11-3.1 เจริญบนอาหาร 5% MEA ง) <i>Sait. podzolica</i> N-8.4 เจริญบนอาหาร 5% MEA เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) แถบมาตราส่วน เท่ากับ 10 ไมโครเมตร.....	107
ภาพที่ 4.13 ลักษณะหยดไขมันภายในเซลล์ของยีสต์อุดมไขมัน 4 สายพันธุ์ ก) <i>Pap. laurentii</i> N-16.2 ข) <i>Rh. sphaerocarpa</i> (11-14.4) ค) <i>Sait. podzolica</i> 11-11-3.1 ง) <i>Sait. podzolica</i> N-8.4 เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง YM สูตรดัดแปลงโดยลดปริมาณไนโตรเจนลง 20 เท่า ย้อมด้วยสีไนล์ เรด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ซ้าย) และกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ขวา) (กำลังขยาย 1000 เท่า) แถบมาตราส่วนเท่ากับ 10 ไมโครเมตร.....	108
ภาพที่ 4.14 องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมันที่มีอัตราส่วน คาร์บอน/ไนโตรเจน เท่ากับ 155 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน.....	110
ภาพที่ 4.15 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมไขมัน 4 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตไบอัส.....	114
ภาพที่ 4.16 การเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ ของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 เมื่อเจริญใน 6%-DSLH และ 6%-SLH.....	115
ภาพที่ 4.17 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 เมื่อผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบอัสที่ผ่าน (12%-DSLH, PD) และไม่ผ่านการปรับต่างเกิน (12%-SLH, PN) (GD กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH; GN กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-SLH) ข้อมูลแสดง เป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ซึ่งได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$).....	116

ภาพที่ 4.18 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH และผลิตน้ำมันใน 12%-SLH..... 119

ภาพที่ 4.19 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH และผลิตน้ำมันใน 12%-DSLH..... 119

ภาพที่ 4.20 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยง *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH และ 12%-DSLH โดยใช้กล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร 6%-DSLH..... 120

ภาพที่ 4.21 ผลของอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ซึ่งได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)..... 121

ภาพที่ 4.22 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน เท่ากับ ก) 24 และ ข) 60..... 123

ภาพที่ 4.23 ผลของปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เติมใน 12%-SLH ต่อ ก) ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ และปริมาณเซลล์ ข) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ซึ่งได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)..... 124

ภาพที่ 4.24 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร..... 125

ภาพที่ 4.25 ก) ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ข) ปริมาณเซลล์ และ ค) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร และแปรผันพีเอช เริ่มต้นเป็น 4.5 (●), 5.0 (■), 5.5 (◆) และ 6.0 (▲)..... 129

ภาพที่ 4.26 ปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน และกรดไขมันอื่น ๆ ในน้ำมันของยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อเจริญใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5 เปรียบเทียบกับน้ำมันของพืชที่ใช้ผลิตเป็นไบโอดีเซล 132

ภาพที่ 4.27 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-SLH และ 12%-DSLH 137

ภาพที่ 4.28 ก) ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ข) ปริมาณเซลล์ และ ค) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่แปรผันอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เป็น 21,182 (●), 24,616 (▲) และ 27,693 (■)..... 139

ภาพที่ 4.29 ก) ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ข) ปริมาณเซลล์ และ ค) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตเป็น 0 (●), 0.5 (■), 0.75 (◆) และ 1.0 (▲) กรัม/ลิตร 142

ภาพที่ 4.30 ก) ปริมาณน้ำมันสะสมใน ข) ปริมาณเซลล์ และ ค) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่ไม่ปรับอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร และแปรผันพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 (■), 5.5 (●) และ 6.0 (▲)..... 144

ภาพที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของกาแล็กโตสในช่วงความเข้มข้น 0 - 20 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 190

ภาพที่ ง.2 กราฟมาตรฐานของอะราบิโนสในช่วงความเข้มข้น 0 - 20 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 191

ภาพที่ ง.3 กราฟมาตรฐานของเซลโลโบไอโอสในช่วงความเข้มข้น 0 - 20 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 192

ภาพที่ ง.4 โครมาโทแกรมของกาแล็กโตส และอะราบิโนส ของ 12%-SLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 193

ภาพที่ ง.5 โครมาโทแกรมของกาแล็กโตส และอะราบิโนส ของ 12%-DSLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 194

ภาพที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของเฟอร์ฟูรัลในช่วงความเข้มข้น 0.05 - 0.8 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 195

ภาพที่ จ.2 กราฟมาตรฐานของ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) ที่ช่วงความเข้มข้น 0.2 - 1.0 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC..... 196

ภาพที่ จ.3 โครมาโทแกรมของของเฟอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) ของ 12%-SLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	197
ภาพที่ จ.4 โครมาโทแกรมของของเฟอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) ของ 12%-DSLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	198
ภาพที่ ฉ.1 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ <i>Pap. laurentii</i> N-16.2 เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน.....	199
ภาพที่ ฉ. 2 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน.....	199
ภาพที่ ฉ.3 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ <i>Sait. podzolica</i> 11-11.3.1 เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน.....	200
ภาพที่ ฉ.4 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ <i>Sait. podzolica</i> N-8.4 เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน.....	200
ภาพที่ ฉ.5 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ <i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4 เมื่อเจริญใน 12%-SLH เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5 เป็นเวลา 4 วัน.....	201
ภาพที่ ฉ.6 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ <i>Cy. subsufficiens</i> NG8.2 เมื่อเจริญใน 12%-SLH พีเอช 5.5 เป็นเวลา 4 วัน.....	201
ภาพที่ ฉ.7 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ <i>Cy. subsufficiens</i> NG8.2 เมื่อเจริญใน 12%-DSLH พีเอช 5.5 เป็นเวลา 4 วัน.....	202
ภาพที่ ฉ.8 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ <i>Cy. subsufficiens</i> NG8.2 เมื่อเจริญใน 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 0.75 กรัม/ลิตรพีเอช 5.5 เป็นเวลา 4 วัน.....	202

บทที่ 1

บทนำ

1.1 แนวคิด ทฤษฎีที่สำคัญ และสมมุติฐาน

ปัจจุบันพบว่าประชากรในหลายจังหวัดของประเทศไทยเผชิญปัญหาหมอกพิษทางอากาศจากฝุ่นละอองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 2.5 ไมครอน หรือที่เรียกว่า PM 2.5 เกินค่ามาตรฐานส่งผลกระทบต่อสุขภาพ และที่เห็นได้อย่างชัดเจน คือ ต่อระบบทางเดินหายใจ ต้นเหตุหลักของการแพร่กระจาย PM 2.5 ล้วนเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ ได้แก่ มลพิษจากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ เช่น จากระบบรถบรรทุกและรถโดยสาร และจากการเผาวัสดุทางการเกษตรในที่โล่ง (Choochuay และคณะ, 2020; Kayee และคณะ, 2020) รวมถึงไบอ้อย อ้อยเป็นพืชไร่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย พื้นที่เพาะปลูกอ้อยทั้งหมด 12.24 ล้านไร่กระจายอยู่หลายภูมิภาคของประเทศไทย (กลุ่มวิชาการและสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย, 2562) ไบอ้อยจึงเป็นชีวมวลลิกโนเซลลูโลสที่พบได้มากในประเทศไทย มีปริมาณมากถึง 17 ล้านตันต่อปี (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2556) และเนื่องจากไบอ้อยมีความคมการตัดลำอ้อยจึงทำได้ลำบาก ดังนั้นการเผาไบอ้อยก่อนการตัดลำอ้อยจึงเป็นวิธีที่นิยมทำในหมู่เกษตรกร ในขณะที่รถตัดไบอ้อยก็ยังมีราคาสูง อย่างไรก็ตามการกระทำดังกล่าวส่งผลเสียต่อคุณภาพและน้ำหนักของอ้อยที่เก็บเกี่ยวได้ ความอุดมสมบูรณ์ของดินในพื้นที่เพาะปลูก ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศและเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์ภาวะเรือนกระจก (Mugica-Álvarez และคณะ, 2018) ดังนั้นหากไบอ้อยเหล่านี้มีแนวทางถูกนำไปใช้ประโยชน์ จะเป็นการสร้างมูลค่าให้แก่ไบอ้อยลดแรงจูงใจในการเผาไบอ้อย จึงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งของการลดปัญหาได้ ไบอ้อยมีองค์ประกอบหลัก คือ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส (Jutakanoke และคณะ, 2012) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) ด้วยกรดหรือเบสเจือจางภายใต้ภาวะที่มีแรงดันสูง เพื่อทำลายโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส และการย่อย (hydrolysis) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จะได้เป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ ไบอ้อยจึงเป็นวัตถุดิบ ชีวมวลลิกโนเซลลูโลสที่มีศักยภาพ สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่มีมูลค่าสูงได้ ก่อนหน้านี้มีรายงานถึงความสำเร็จในการใช้ไฮโดรไลสเสตของไบอ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล (Krishnan และคณะ, 2010; Jutakanoke และคณะ, 2012) และน้ำมันยีสต์ (Pranimit และคณะ, 2019)

ยีสต์อุดมไขมัน หรือยีสต์โอเลอิจินัส (oleaginous yeast) คือ ยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันและสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ ได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่ยีสต์โดยทั่วไปสามารถผลิตได้ประมาณ 6% ของน้ำหนักเซลล์แห้งสำหรับเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Schulze และคณะ, 2014) กลไกการผลิตและการสะสมไขมันเกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์อุดมไขมันในอาหารที่ปริมาณคาร์บอนสูงและมีปริมาณไนโตรเจนจำกัด คาร์บอนที่มีอยู่มากเกินพอจะถูกลดเปลี่ยนให้เป็นไขมันซึ่งโดยมากจะอยู่ในรูปของ TAG (Triacylglycerol) (Ageitos และคณะ, 2011) ซึ่งหนึ่งโมเลกุลของ TAG ประกอบด้วยกรดไขมัน 3 โมเลกุลและกลีเซอรอล 1 โมเลกุล น้ำมันที่ผลิตได้ถูกเรียกว่า single cell oil (SCO) และเก็บในรูปแบบของหยดน้ำมันภายในเซลล์ ความสามารถผลิตและสะสมไขมันของยีสต์อุดมไขมันเป็นลักษณะที่มีความจำเพาะดังจะเห็นได้จากยีสต์ประมาณ 600 สปีชีส์พบว่ามีน้อยกว่า 30 สปีชีส์ที่มีรายงานว่าเป็นยีสต์อุดมไขมัน (Qin และคณะ, 2017) ซึ่งโดยมากจัดอยู่ในยีสต์ *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospirium*, *Trichosporon* และ *Lipomyces* (Ageitos และคณะ, 2011) และมีรายงานว่ายีสต์อุดมไขมันบางสายพันธุ์ในยีสต์ *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* และ *Lipomyces* สะสมไขมันในเซลล์ได้สูงถึง 70% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) (Kitcha และ Cheirsilp, 2011) กรดไขมันที่พบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันยีสต์อุดมไขมัน ได้แก่ กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดปาล์มิตอเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) กรดลิโนเลอิก (C18:2) กรดลิโนเลนิก (C18:3) ซึ่งคล้ายกับกรดไขมันที่พบในน้ำมันจากพืช (Sitepu และคณะ, 2014) จึงสามารถนำน้ำมันยีสต์ไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายอุตสาหกรรม เช่น น้ำมันของยีสต์หลายสายพันธุ์มีกรดปาล์มิติก กรดสเตียริก และกรดโอเลอิก (Ageitos และคณะ, 2011) ปริมาณสูงคล้ายกับที่พบในน้ำมันจากพืชอาหารที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลและน้ำมันหล่อลื่น เช่น น้ำมันเรพซีด น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันปาล์ม (Patel และ Shah, 2015; Heikal และคณะ, 2017) จึงสามารถใช้ทดแทนน้ำมันพืชอาหารในอุตสาหกรรมน้ำมันเชื้อเพลิงและน้ำมันหล่อลื่น ช่วยลดปัญหาการขาดแคลนและการเพิ่มสูงขึ้นของราคาน้ำมันพืชอาหาร ที่อาจเกิดจากการแข่งขันในการใช้วัตถุดิบระหว่างอุตสาหกรรมอาหารและเชื้อเพลิงได้ อีกทั้งการผลิตน้ำมันจากยีสต์ยังมีข้อดีกว่าน้ำมันจากพืช คือ ยีสต์เจริญเร็ว ปริมาณน้ำมันต่อเซลล์ (oil content) สูง (Li และคณะ, 2008) สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายจึงไม่ต้องใช้แรงงานจำนวนมาก ไม่ต้องการพื้นที่เพาะปลูกมาก การผลิตไม่ถูกจำกัดด้วยสภาพภูมิอากาศหรือฤดูกาล ขยายส่วนการผลิตได้ง่าย (Kitcha และ Cheirsilp, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันของยีสต์บางชนิด เช่น *Yarrowia lipolytica* (Papanikolaou และคณะ, 2001) และ *Rhodospiridium toruloides* (Wu และคณะ, 2011) มีสัดส่วนของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบคล้ายกับที่พบในเนยโกโก้ ซึ่งเป็นกลุ่มไขมันที่มีลักษณะพิเศษ (exotic fat) มีราคาแพง น้ำมันของยีสต์เหล่านี้จึงสามารถใช้ทดแทนเนยโกโก้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางได้ และน้ำมันของยีสต์บางสายพันธุ์มีกรดไขมันที่มีมูลค่าสูงเป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก จึงเหมาะแก่การ

นำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น น้ำมันของ *Trichosporon porosum* มีกรดลิโนเลอิก (C18:2) หรือโอเมก้า 6 เป็นองค์ประกอบสูงถึง 17.8% (Schulze และคณะ, 2014) กรดลิโนเลอิกเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมไขมันและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยป้องกันและรักษาโรคหลายชนิด เช่น หัวใจ เบาหวาน และมะเร็ง (Khanal, 2004) น้ำมันของ *Pichia segobiensis* ที่มีกรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) เป็นองค์ประกอบสูงถึง 16% (Schulze และคณะ, 2014) ขณะเดียวกันพบว่าน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมัน *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2 ที่ถูกคัดแยกและเก็บรักษาไว้ที่ศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีกรดไขมันปาล์มิโตเลอิกเป็นองค์ประกอบสูงถึง 22.25% (รัชนา พระนิมิตร, 2560) ซึ่งสูงกว่าที่มีรายงานในยีสต์อุดมน้ำมันสายพันธุ์อื่น ๆ อีกทั้งยังมีปริมาณสูงกว่าที่พบในน้ำมันแมคคาเดเมีย และน้ำมันเมล็ดซีบัค (sea buckthorn seed oil) ซึ่งเป็นแหล่งของกรดปาล์มิโตเลอิกในธรรมชาติ ที่พบเพียง 12.48% (Carrillo และคณะ, 2017) และ 21.5% (Yang และ Kallio, 2001) ตามลำดับ กรดปาล์มิโตเลอิกหรือ โอเมก้า 7 เป็นกรดไขมันราคาแพง ช่วยลดปริมาณไขมัน triglyceride และ LDL (คอเลสเตอรอล) ในกระแสเลือด จึงช่วยลดการอุดตันของเส้นเลือดหัวใจได้ เหมาะนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Griel และคณะ, 2008; Kolouchová และคณะ, 2015) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการผลิตน้ำมันและการผลิตกรดปาล์มิโตอิกของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ในงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

อย่างไรก็ตามการผลิตน้ำมันจากยีสต์อุดมน้ำมันยังคงมีข้อจำกัดเรื่องต้นทุนในการผลิตที่สูง โดยค่าใช้จ่ายหลักของการผลิต คือ ค่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต (Fontanille และคณะ, 2012) ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกจะสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ เป็นที่น่าสนใจว่ายีสต์อุดมน้ำมันสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ไฮโดรเจน คากน้ำตาล กลีเซอรอล รวมทั้งน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส (Qin และคณะ, 2017) ผู้วิจัยจึงสนใจผลิตและหาภาวะเหมาะสมของการผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันโดยใช้ไบโอบายเป็นวัตถุดิบ ก่อนหน้านี้มีรายงานการผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันจากไฮโดรไลเสตลิกโนเซลลูโลสหลายชนิด เช่น การผลิตน้ำมันยีสต์ *Trichosporon fermentans* จากไฮโดรไลเสตของฟางข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางและกำจัดสารยับยั้งการเจริญด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยสามารถผลิตน้ำมันได้ 11.5 กรัม/ลิตร และมีปริมาณของน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 40.1% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ซึ่งสูงกว่าปริมาณผลผลิตที่ได้จากการผลิตในไฮโดรไลเสตของฟางข้าวที่ไม่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญ (Huang และคณะ, 2009) เช่นเดียวกับ Liang และคณะ (2012) พบว่าการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cryptococcus curvatus* ในไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยฟางข้าวฟางหวานที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟแล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ให้ผลผลิตน้ำมันสูงกว่าการผลิตในไฮโดรไลเสตที่เตรียมด้วยวิธีเดียวกัน

แต่ไม่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญ Yu และคณะ (2011) ผลิตน้ำมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง Galafassi และคณะ (2012) ผลิตน้ำมัน *Rhodotorula graminis* จากไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพด Xavier และคณะ (2017) พบว่ายีสต์ *Lipomyces starkeyi* สามารถผลิตน้ำมันได้ในอาหารเฮมิเซลลูโลสไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นอกจากนี้ยังมีรายงานปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมันยีสต์ เช่น Chen และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตน้ำมันยีสต์ *T. cutaneum* จากไฮโดรไลเสตของซังข้าวโพด พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิการบ่ม ค่าพีเอช และการเติมสารอาหารได้แก่ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ และ KCl ส่งผลให้ปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้น ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมของการผลิตน้ำมัน ปริมาณน้ำมันเพิ่มสูงขึ้น 26.5% เมื่อเทียบกับการผลิตในภาวะปกติ การเพิ่มแหล่งไนโตรเจน 5 ชนิด ได้แก่ ยูเรีย เพปโทน $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl และ ทรีปโทน ไม่มีผลส่งเสริมการผลิตน้ำมันยีสต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในไฮโดรไลเสตของซังข้าวโพด มีปริมาณไนโตรเจนในสัดส่วนที่เหมาะสมกับแหล่งคาร์บอนและเพียงพอต่อการผลิตน้ำมันยีสต์แล้ว Li และคณะ (2006) รายงานว่ายีสต์ *R. toruloides* สะสมน้ำมันของได้มากกว่า 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอน/ไนโตรเจนมากกว่า 570 และน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์จะลดลงเหลือต่ำกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่ออัตราส่วนของคาร์บอน/ไนโตรเจนต่ำกว่า 100 สอดคล้องกับ Beopoulos และคณะ (2009) ที่รายงานว่าการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์ *Y. lipolytica* จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของคาร์บอน/ไนโตรเจนในอาหารจาก 150 เป็น 350 ขณะเดียวกันพบว่าภาวะจำกัดสารอาหารบางชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ มีผลต่อการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์อุดมน้ำมันเช่นเดียวกับภาวะจำกัดไนโตรเจน คือ ยีสต์จะถูกชักนำให้สะสมน้ำมันเมื่อสารอาหารนั้น ๆ ถูกใช้หมด *R. toruloides* Y4 มีปริมาณน้ำมันสะสมสูงสุด 58.3% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงแต่มีปริมาณฟอสฟอรัสจำกัด ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส 9552 (Wu และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวยังผลิตน้ำมันได้สูงในอาหารที่มีปริมาณซัลเฟอร์จำกัดอีกด้วย โดยมีปริมาณน้ำมันสะสมเพิ่มขึ้นจาก 20.8% เป็น 58.3% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ซัลเฟอร์เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 150 เป็น 46,750 (Wu และคณะ, 2011) จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่ายีสต์อุดมน้ำมันหลายสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลในไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยชีวมวลลิกโนเซลลูโลสได้ และชีวมวลลิกโนเซลลูโลสก็เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตน้ำมันยีสต์ ขณะเดียวกันพบว่ายีสต์ต่างสายพันธุ์นั้นมีความต้องการสารอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันที่แตกต่างกัน (Sitepu และคณะ, 2013)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองยีสต์ผลิตน้ำมัน และหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันที่คัดกรองได้ และยีสต์อุดมน้ำมัน *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2 ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าผลิตกรดปาล์มิโตเลอิกได้สูง โดยใช้ไฮโดรไลเสตของใบอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางแล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นวัตถุดิบ พร้อมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันยีสต์ที่ผลิตได้

1.2 วัตถุประสงค์

คัดกรองยีสต์ผลิตน้ำมันและหาภาวะซึ่งเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์โดยใช้ไฮโดรไลเสตจากการย่อยใบอ้อยเป็นวัตถุดิบ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

- 1.3.1 คัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดิน น้ำ และวัสดุชีวภาพอื่น ๆ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์
- 1.3.2 คัดกรองยีสต์อุดมน้ำมันและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ยีสต์ที่คัดกรองได้
- 1.3.3 คัดกรองยีสต์อุดมน้ำมันซึ่งผลิตน้ำมันสูงในอาหารไฮโดรไลเสตของใบอ้อย
- 1.3.4 หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตและสะสมน้ำมันในอาหารไฮโดรไลเสตของใบอ้อยของยีสต์อุดมน้ำมันที่คัดกรองได้
- 1.3.5 หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันและกรดปาล์มิโตเลอิกของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ในอาหารไฮโดรไลเสตของใบอ้อย
- 1.3.6 วิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบและคุณสมบัติบางประการของน้ำมันยีสต์ที่ผลิตได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัยนี้

ได้ยีสต์อุดมน้ำมันที่ผลิตและสะสมน้ำมันในเซลล์ปริมาณสูง ทราบภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันที่คัดกรองได้ในไฮโดรไลเสตของใบอ้อย และทราบภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันและผลิตกรดปาล์มิโตเลอิกของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ในไฮโดรไลเสตของใบอ้อย

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ยีสต์อุดมน้ำมัน

ยีสต์อุดมน้ำมันหรือยีสต์โอเลอิจินัส (oleaginous yeast) คือ ยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ได้มากกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) (Sitepu และคณะ, 2014) และบางสายพันธุ์อาจผลิตและสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ได้มากถึง 70% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) (Munch และคณะ, 2015) ได้เริ่มมีการศึกษาการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1878 โดยมีรายงานผลการศึกษาการผลิต การสะสมน้ำมัน ตลอดจนชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของยีสต์หลายสายพันธุ์ เช่น *Metschnikowia pulcherrima* (เดิม *Torula pulcherrima*) (Woodbine, 1959) *Galactomyces candidus* (เดิม *Oidium lactis*) (Piskur, 1939) ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 มีการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida utilis* เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมทดแทนเนื้อสัตว์ในประเทศเยอรมัน (Goldberg, 1985) พร้อมทั้งได้เริ่มศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Guehomyces pullulans* (เดิม *Endomycopsis vernalis*) ในระดับโรงงานต้นแบบ (pilot scale) เพื่อใช้ผลิตน้ำมันจากยีสต์ (Lindner, 1922) การศึกษาประสบความสำเร็จในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 และน้ำมันจากยีสต์ที่ผลิตได้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมและเชื้อเพลิงเพื่อลดปัญหาการขาดแคลนสารอาหารและเชื้อเพลิง (Lundin, 1950)

ยีสต์อุดมน้ำมันสามารถพบได้ทั่วไปในตัวอย่างจากธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ (Schulze และคณะ, 2014) และจากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้ (Jiru และคณะ, 2017; Maina และคณะ, 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานการคัดเลือกได้จากตัวอย่างจากอุตสาหกรรม เช่น วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันปาล์มและจากโรงงานผลิตไบโอดีเซล (Kitcha และ Cheirsilp, 2011) ความสามารถในการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์นี้พบว่าไม่มีความจำเพาะกับยีสต์หรือสปีชีส์ของยีสต์ แต่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ (Sitepu และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์อุดมน้ำมันหลายสายพันธุ์ที่มีรายงานก่อนหน้านี้มักจัดอยู่ในยีสต์ *Yarrowia*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Trochosporon* และ *Cryptococcus* (จำแนกยีสต์ใหม่เป็น *Naganisia*, *Cutaneotrichosporon*, *Papiliotrema* และ *Saitozyma*) (Beopoulos และ Nicaud, 2012)

การผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันจะถูกกระตุ้นเมื่อยีสต์ถูกเพาะเลี้ยงในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ และมีสารอาหารอื่น (โดยทั่วไป คือ ไนโตรเจน) จำกัด (Ratledge และ Wynn, 2002) น้ำมันที่ผลิตโดยมากอยู่ในรูป triacylglycerol (TAG) และสะสมไว้ในไซโตพลาสซึมในรูปของหยดน้ำมัน (oil droplet) (ภาพที่ 2.1) (Sitepu และคณะ, 2014) ความสามารถในการผลิต

และสะสมน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์และภาวะการเพาะเลี้ยง กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่ยีสต์อุดมน้ำมันผลิตได้นั้นก็แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะการเจริญ และภาวะการเพาะเลี้ยง แต่โดยมากกรดไขมันที่มักพบเป็นองค์ประกอบหลัก คือ กรดมายริสติก (C14:0) กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) กรดลิโนเลอิก (C18:2) และกรดลิโนเลนิก (C18:3) ดังนั้นน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันจึงมีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ประโยชน์ในหลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร การแพทย์ เครื่องสำอาง เชื้อเพลิงชีวภาพ รวมทั้งการผลิตสารเคมีชีวภาพในอุตสาหกรรมโอเลโอเคมี (oleochemical industry) (Beopoulos และ Nicaud, 2012)

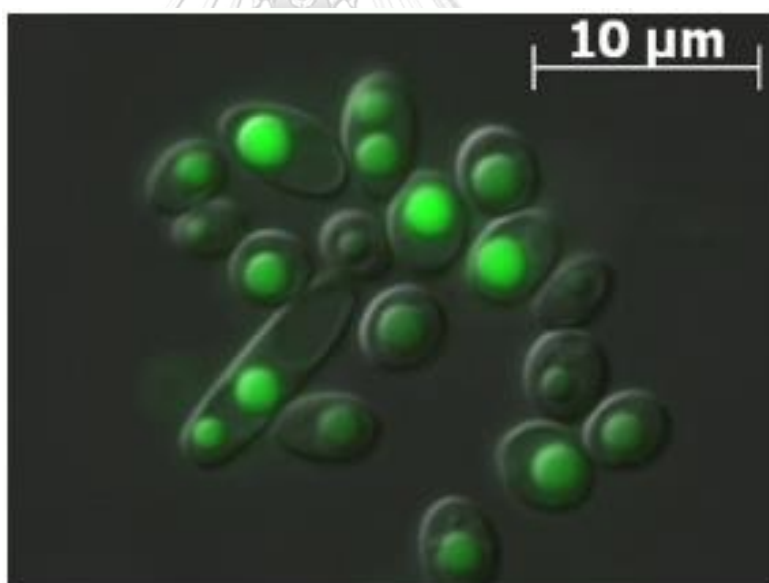
น้ำมันของ *Pichia segobensis* SSOH12 มีปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิก หรือโอเมก้า 7 และ กรดลิโนเลอิก หรือโอเมก้า 6 สูงถึง 16% และ 7.5% ตามลำดับ กรดไขมันทั้งสองชนิดนี้เป็นกรดไขมันที่มีประโยชน์และจำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ กรดปาล์มิโตเลอิกมีคุณสมบัติช่วยลดระดับคอเรสเตอรอลและ LDL (low density lipoprotein) ในเลือด จึงช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ (Williams, 2000; Gao และคณะ, 2003) อีกทั้งยังช่วยป้องกันการเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ซึ่งมีสาเหตุจากพันธุกรรมและพฤติกรรมการใช้ชีวิต (Morgan และ Dhayal, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า กรดปาล์มิโตเลอิก สามารถลดการเกิดริ้วรอยของผิวหนัง (Hayashi และคณะ, 2003) ดังนั้นน้ำมันของ *P. segobensis* SSOH12 จึงมีศักยภาพนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และเครื่องสำอาง (Mitsui, 1997; Schulze และคณะ, 2014)

น้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันหลายสายพันธุ์ เช่น *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi* และ *Cryptococcus curvatus* (Hassan และคณะ, 1994; Hassan และคณะ, 1995; Papanikolaou และคณะ, 2001; Papanikolaou และคณะ, 2003; Wu และคณะ, 2011) ประกอบด้วยกรดไขมันหลัก 3 ชนิด คือ กรดปาล์มิติก กรดโอเลอิก และกรดสเตียริก และมีปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัวรวมอยู่ในช่วง 55-67% ใกล้เคียงกับเนยโกโก้ (cocoa butter) หรือไขมันที่สกัดจากผลโกโก้ ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง (Papanikolaou และคณะ, 2001) น้ำมันของยีสต์กลุ่มนี้จึงมีศักยภาพนำไปใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้

น้ำมันของ *Rhodotorula mucilaginosa* IIP132 สามารถเคลือบเป็นฟิล์มบางบนวัสดุได้ดี และช่วยลดแรงเสียดทานและการสึกหรอของเครื่องยนต์ได้ (Bandhu และคณะ, 2018) จึงมีศักยภาพเป็นน้ำมันหล่อลื่นชีวภาพ นอกจากนี้กรดไขมันหลักที่พบในน้ำมันยีสต์อุดมน้ำมันเป็นกลุ่มที่มีคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม คล้ายกับที่พบในน้ำมันของพืชน้ำมันซึ่งเป็นวัตถุดิบของการผลิตไบโอดีเซล เช่น น้ำมันเรพซิด น้ำมันปาล์ม และน้ำมันถั่วเหลือง (Steen และคณะ, 2010; Beopoulos และ Nicaud,

2012) ดังนั้นน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันหลายสายพันธุ์จึงได้ถูกนำมาศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล (Tanimura และคณะ, 2014; Wang และคณะ, 2018a)

เมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันและจุลสาหร่ายอุดมน้ำมัน การผลิตน้ำมันจากยีสต์มีข้อดีกว่า คือ ยีสต์เพาะเลี้ยงง่าย เจริญเร็ว การเพาะเลี้ยงไม่มีผลกระทบจากฤดูกาลและสภาพอากาศ ควบคุมและขยายส่วนการผลิตง่าย ใช้พื้นที่และแรงงานน้อย (Matsakas และคณะ, 2015) และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราอุดมน้ำมัน ยีสต์ทนต่อโอออนโทละได้ดีกว่า และต้องการออกซิเจนในการเจริญต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอุดมน้ำมัน ช่วงพีเอชที่ยีสต์สามารถเจริญได้กว้างกว่า (Lamers และคณะ, 2016) เก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายกว่า เนื่องจากเซลล์ยีสต์มีขนาดใหญ่ (Santos และ Reis, 2014) ยีสต์สามารถเจริญได้ที่ช่วงพีเอชต่ำ จึงช่วยลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย (Sitepu และคณะ, 2014) นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด (ตารางที่ 2.1) เช่น กลูโคส ไส้โลส กลีเซอรอล กรดอะซิติก รวมทั้งน้ำตาลในไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (agricultural residue) ของเสีย (waste) และผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) จากโรงงานอุตสาหกรรม



ภาพที่ 2.1 หยดน้ำมันในเซลล์ *Y. lipolytica* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Thevenieau และ Nicaud, 2013)

ตารางที่ 2.1 การผลิตน้ำมันยีสต์ของยีสต์อุณหภูมิต่างในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

ยีสต์อุณหภูมิต่าง	ปริมาณน้ำมันสะสม ในเซลล์ (%, น้ำหนัก/น้ำหนัก เซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอน	อ้างอิง
<i>Crptococcus musci</i>	44.7	กลูโคส	Tanimura และคณะ (2014)
<i>Cr. curvatus</i>	33.5	ไฮโดรไลเสตฟางข้าว สาลี	Yu และคณะ (2011)
<i>Trichosporon fermantans</i>	40.1	ไฮโดรไลเสตฟางข้าว	Huang และคณะ (2009)
<i>T. fermentans</i>	35.3	กากน้ำตาล	Zhu และคณะ (2008)
<i>T. cutaneum</i>	23.5	ไฮโดรไลเสตใบและซัง ข้าวโพด	Huang และคณะ (2011)
<i>T. cutaneum</i>	35.9	ไฮโดรไลเสตซังข้าวโพด	Chen และคณะ (2013)
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	38.25	กากน้ำตาล	Jiru และคณะ (2017)
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	48.2	กรดอะซิติก	Huang และคณะ (2016)
<i>R. toruloides</i>	63.4	ไฮโดรไลเสตแป้งมัน สำปะหลัง	Wang และคณะ (2012)
<i>R. glutinis</i>	20	น้ำทิ้งโรงงานผลิตผงชู รส	Xue และคณะ (2008)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	58.5	ไฮโดรไลเสตชานอ้อย	Tsigie และคณะ (2011)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	28.4	กรดอะซิติก	Xavier และคณะ (2017)

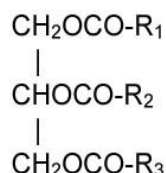
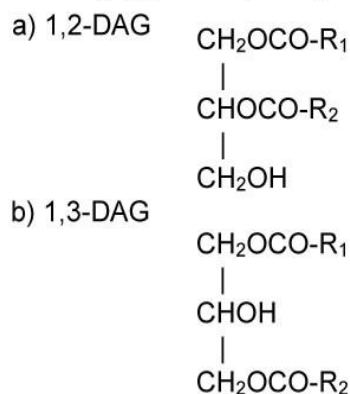
2.2 ไขมันและกรดไขมัน

2.2.1 ไขมัน (lipid)

ไขมัน คือ สารชีวโมเลกุลที่ประกอบด้วยธาตุหลัก 3 ชนิด คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ไขมันมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อีเทอร์ ไดเอธิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เอทานอล และเมทานอล เป็นต้น โมเลกุลของไขมันมีลักษณะเป็น โมเลกุลแบบแอมฟิฟิลิก (amphiphilic molecule) คือ ประกอบด้วยส่วนไม่มีขั้ว มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เชื่อมต่อกับส่วนมีขั้ว ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ไขมันมีบทบาทสำคัญต่อจุลินทรีย์ คือ ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ เป็นสารสื่อสัญญาณภายในเซลล์ และเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Balan, 2019) สามารถจำแนกประเภทไขมันตามโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่

- 1) ไขมันธรรมดา (simple lipid) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ โดยแบ่งเป็นประเภทย่อยได้ 2 ประเภท คือ ไขมันแท้ (true fat) และ ขี้ผึ้ง (wax) ไขมันแท้เป็นไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันและกลีเซอรอล ได้แก่ ไขมัน (fat) และ น้ำมัน (oil) ซึ่งโดยมากมักพบในรูปของ triacylglycerol (TAG) และ diacylglycerol (DAG) (ภาพที่ 2.2) มีคุณสมบัติเป็นกลาง (neutral lipid) ขี้ผึ้ง คือ สารประกอบเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมันรวมตัวกับแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเพียงหมู่เดียว เป็นไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยมากพบที่ใบ กิ่ง และลำต้นของพืช ทำหน้าที่ป้องกันการระเหยของน้ำ
- 2) ไขมันเชิงประกอบ (compound lipid) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และมีสารอื่นรวมอยู่ด้วย ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ไกลโคลิพิด (glycolipid) และลิพوپโรตีน (lipoprotein)
- 3) อนุพันธ์ไขมัน (derived lipid) เป็นสารประกอบที่ได้จากการเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของไขมันธรรมดาและไขมันเชิงประกอบ ได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์ สเตียรอยด์ คอเรสเตอรอล คาโรทีนอยด์ และวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน เป็นต้น

ยีสต์อุดมน้ำมันผลิตและสะสมไขมันในรูปของ triacylglycerol มากถึง 80-90% ของปริมาณน้ำมันทั้งหมด รองลงมา คือ steryl ester (SE) (Beopoulos และ Nicaud, 2012) นอกจากนี้ยังผลิตและสะสมไขมันชนิดอื่น ๆ เช่น diacylglycerol ฟอสโฟลิพิด ไฮโดรคาร์บอน กรดไขมันอิสระ สเตียรอยด์ สฟิงโกลิพิด และไกลโคลิพิด เป็นต้น เช่นเดียวกับยีสต์ทั่วไป (Sitepu และ คณะ, 2014)

Triacylglycerol (TAG)**Diacylglycerol (DAG)**

$$1,2\text{-DAG}:1,3\text{-DAG} = 3:7$$

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของ triacylglycerol (TAG) และ diacylglycerol (DAG) R1, R2 และ R3 แทนกรดไขมัน (Yanai และคณะ, 2007)

2.2.2 กรดไขมัน (fatty acid)

กรดไขมัน คือ สารประกอบอินทรีย์ ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic acid, -COOH) หนึ่งหมู่ต่อกับปลายด้านหนึ่งของโมเลกุลไฮโดรคาร์บอนที่เรียงต่อกันเป็นสายยาว โดยมากกรดไขมันจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ ตั้งแต่ 2 - 24 คาร์บอนอะตอม กรดไขมันแต่ละชนิดจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอม ชนิดพันธะ จำนวนและตำแหน่งพันธะคู่ในโมเลกุลต่างกัน กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1) กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid)

กรดไขมันอิ่มตัว คือ กรดไขมันที่มีคาร์บอนเรียงต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวเท่านั้น มีโครงสร้างเป็นโซ่ยาวสายตรง (Grundy, 2013) มีจุดหลอมเหลวสูง แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง น้ำมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่มากจึงอยู่ในสภาพที่เป็นไขและแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำหรือในฤดูหนาว เช่น ไขมันเนย น้ำมันหมู น้ำมันวัว เป็นต้น กรดไขมันอิ่มตัวที่พบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันทั่วไป เช่น กรดไมริสติก (myristic acid, C14:0), กรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0) และกรดสเตียริก (stearic acid, C18:0) (Lottenberg และคณะ, 2018)

2) กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid)

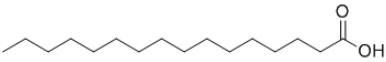





กรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ กรดไขมันที่โซ่คาร์บอนมีการเรียงต่อกันด้วยพันธะคู่อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง มีจุดหลอมเหลวต่ำ มีสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้จุดหลอมเหลวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะขึ้นอยู่กับจำนวนคาร์บอนอะตอม ตลอดจนจำนวนและตำแหน่งพันธะคู่ในโมเลกุล ทั้งนี้ไขมันพืชและไขมันจากสัตว์โดยมากจะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ กรดไขมันไม่อิ่มตัวจำแนกตามจำนวนพันธะคู่ในโมเลกุล ได้เป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่ในโซ่คาร์บอน 1 ตำแหน่ง เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid, C16:1) และ กรดโอเลอิก (oleic acid, C18:1) และ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) กรดไขมันชนิดนี้จะมีจำนวนพันธะคู่ในโซ่คาร์บอนมากกว่า 2 ตำแหน่ง เช่น กรดลิโนเลอิก (linoleic acid, C18:2) กรดลิโนเลนิก (linolenic acid, C18:3) และกรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid, C20:4) เป็นต้น

กรดไขมันที่พบในยีสต์ส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบอยู่ใน triacylglycerol (TAG) และ diacylglycerol (DAG) เดิมชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์ยีสต์ถูกใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณา เพื่อจัดจำแนกสปีชีส์ของยีสต์ก่อนการพัฒนาการจำแนกยีสต์ด้วยวิธีทางโมเลกุล (Augustyn และคณะ, 1992; Sitepu และคณะ, 2014) เพราะกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในไขมันที่สะสมในเซลล์ของยีสต์แต่ละสปีชีส์แตกต่างกัน (Sitepu และคณะ, 2013) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยทั่วไปกรดไขมันที่พบในน้ำมันของยีสต์อุดมไขมันมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 14 ถึง 20 อะตอม แต่ที่พบมากที่สุด คือ กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม (ตารางที่ 2.3) โดยชนิดกรดไขมันที่พบมากที่สุด คือ กรดโอเลอิก (C18:1) รองลงมา คือ กรดปาล์มิติก (C16:0) และ กรดสเตียริก (C18:0) ตามลำดับ (Meesters และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันที่มีมูลค่าสูง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) กรดลิโนเลอิก (C18:2) และกรดลิโนเลนิก (C18:3) เป็นต้น ในยีสต์บางสายพันธุ์ (Schulze และคณะ, 2014; Kolouchová และคณะ, 2015)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณกรดไขมันหลักที่พบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์อดมน้ำมันบางชนิด

ยีสต์อดมน้ำมัน	ปริมาณกรดไขมัน (% โดยน้ำหนัก)								อ้างอิง
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3		
<i>Papiliotrema laurentii</i> AM113	0.9	10.8	9.7	6.5	60.3	11.8	-	Wang และคณะ (2018a)	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> TJY15a	1.5	22.7	1.7	4.1	34.1	35.8	-	Li และคณะ (2010)	
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> SY89	-	18.63	0.50	5.68	53.82	13.34	5.47	Jiru และคณะ (2017)	
<i>Rhodospiridium toruloide</i> NBRC0559	1.31	1.86	0.43	17.60	64.21	9.11	1.64	Tanimura และคณะ (2014)	
<i>R. toruloide</i> AS 2.1389	1.3	35.3	5.7	4.5	51.4	1.8	-	Lin และคณะ (2014)	
<i>Saitozyma podzolica</i> (เดิม) <i>Cryprococcus podzolicus</i> CPOH4	-	18.4	0.3	5.3	59.4	8.7	0.9	Schulze และคณะ (2014)	
<i>Trichosporon porosum</i> TPST6	-	19.5	0.3	17.0	40.4	17.8	1.3	Schulze และคณะ (2014)	
<i>Lipomyces starkeyi</i> NBRC 10381	0.61	4.34	4.70	6.03	74.08	6.75	0.71	Tanimura และคณะ (2014)	
<i>L. starkeyi</i> AS 2.1560	0.7	41.1	4.6	5.1	45.3	3.2	-	Lin และคณะ (2014)	

ตารางที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันหลักที่พบได้ในน้ำมันของยีสต์อุตสาหกรรมน้ำมัน

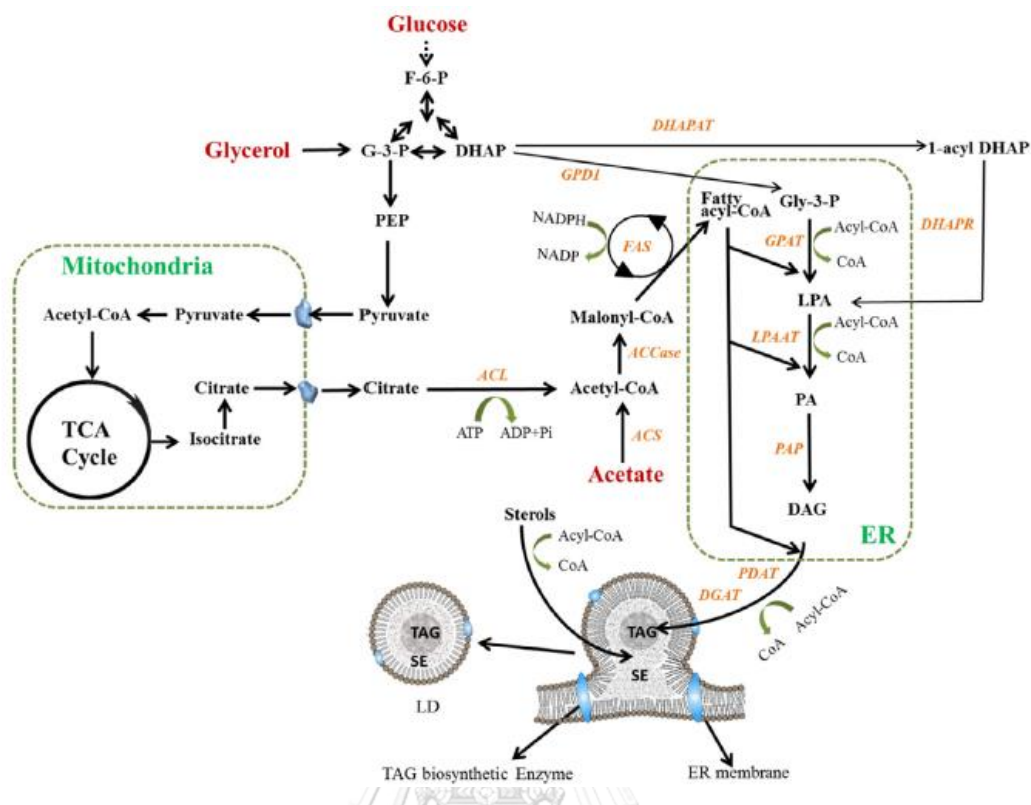
กรดไขมัน	จำนวนคาร์บอน อะตอม:จำนวน พันธะคู่, ตำแหน่งพันธะคู่	โครงสร้างทางเคมี	ชนิดกรดไขมัน
กรดปาล์มติก	C16:0		กรดไขมันอิ่มตัว
กรดปาล์มไมโตเลอิก	C16:1, n-7		กรดไขมันไม่อิ่มตัว เชิงเดี่ยว
กรดสเตียริก	C18:0		กรดไขมันอิ่มตัว
กรดโอเลอิก	C18:1, n-9		กรดไขมันไม่อิ่มตัว เชิงเดี่ยว
กรดลิโนเลอิก	C18:2, n-6		กรดไขมันไม่อิ่มตัว เชิงซ้อน
กรดลิโนเลนิก	C18:3, n-3		กรดไขมันไม่อิ่มตัว เชิงซ้อน

2.3 การสังเคราะห์และสะสมน้ำมันของยีสต์อูตมน้ำมัน

ยีสต์อูตมน้ำมันจะถูกกระตุ้นให้ผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ เมื่อเจริญในภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่มีสารอาหารที่สำคัญบางชนิด เช่น ไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส จำกัด (Huang และคณะ, 2018) โดยวิธีการสังเคราะห์น้ำมันภายในภาวะดังกล่าวเป็นดังนี้

2.3.1 วิธีการสังเคราะห์และสะสมน้ำมันของยีสต์อูตมน้ำมันภายในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด

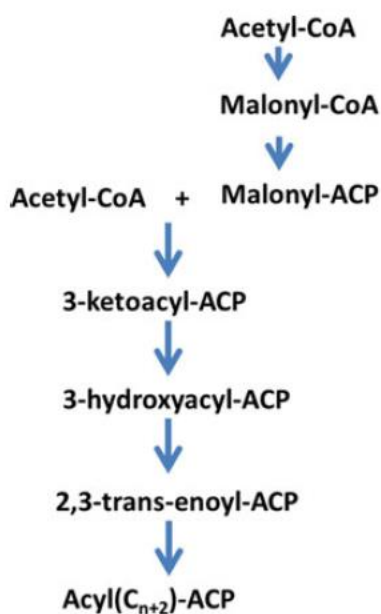
ภายในภาวะที่มีคาร์บอนมากเกินไปแต่มีไนโตรเจนจำกัด โดยที่ยีสต์ยังคงเจริญ แต่กระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ลดต่ำลง และเมื่อไนโตรเจนถูกใช้หมด เอนไซม์ AMP-deaminase จะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยน AMP (adenosine monophosphate) เป็น IMP (inosine 5'-monophosphate) และแอมโมเนียมไอออน ทำให้ปริมาณ AMP ภายในเซลล์ลดลง (Ratledge และ Wynn, 2002) เพื่อดึงเอาแอมโมเนียมไอออนมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำรอง สำหรับสังเคราะห์สารต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Czabany และคณะ, 2007) การลดลงของ AMP ส่งผลต่อการสังเคราะห์สารในวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) เนื่องจาก AMP เป็นสารตั้งต้นร่วม (co-substrate) ของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ทำให้เอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ไม่สามารถเปลี่ยน isocitrate เป็น α -ketoglutarate ได้ ทำให้เกิดการสะสมของ isocitrate ในไมโทคอนเดรีย isocitrate ที่สะสมนี้จะถูกเอนไซม์ isocitrate acotinase เปลี่ยนไปเป็น citrate โดยปริมาณ citrate จะเกิดอย่างสมดุลกับปริมาณ isocitrate และเมื่อมีปริมาณ citrate ในไมโทคอนเดรียมาก citrate จะถูกส่งออกไปยังไซโทพลาสซึมผ่าน citrate/malate shuttle แล้วเปลี่ยนไปเป็น acetyl-CoA โดยเอนไซม์ ATP-citrate lyase (ACL) (Qin และคณะ, 2017) (ภาพที่ 2.3) ซึ่งกลไกนี้จะไม่พบในยีสต์ทั่วไป แต่พบได้เฉพาะในยีสต์อูตมน้ำมันเท่านั้น (Rodriguez และคณะ, 2016)



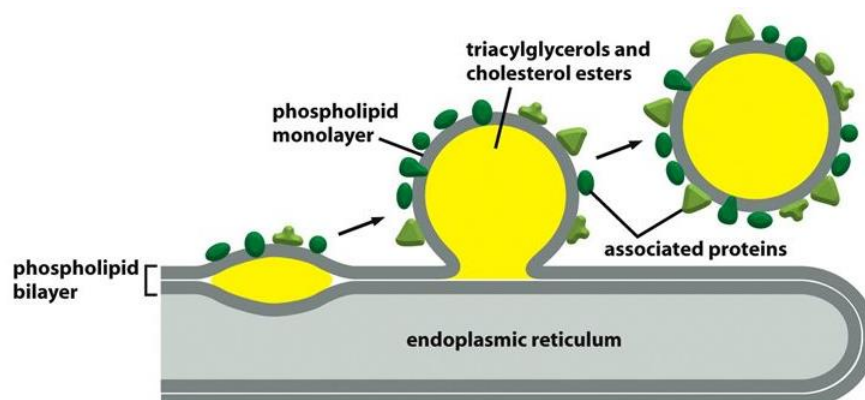
ภาพที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์และสะสมน้ำมันของยีสต์อุดมไขมันในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Qin และคณะ, 2017)

acetyl-CoA ที่สะสมในไซโทพลาสซึมจะถูกใช้เป็นส่วนตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยขั้นแรก acetyl-CoA จะถูกเติมหมู่คาร์บอกซิลโดยการทำงานของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ได้เป็น malonyl-CoA ต่อมา malonyl-CoA ที่ได้จะเกิดการแลกเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลกับ acyl carrier protein (ACP) กลายเป็น malonyl-ACP ซึ่งต่อมาจะเป็นสารตัวกลางที่เข้าสู่กระบวนการรวมตัวกับ acetyl-CoA (ภาพที่ 2.4) ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เป็น fatty acyl-CoA ภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) โดยอาศัยพลังงาน (NADPH) และการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthetase (FAS) ซึ่งเป็น multi enzymatic complex เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขณะเดียวกันก็จะเกิดกระบวนการเพิ่มจำนวนอะตอมของคาร์บอน (elongation) และกระบวนการเพิ่มพันธะคู่ในกรดไขมัน (desaturation) โดยการทำงานของเอนไซม์ elongase และ desaturase ตามลำดับ ได้เป็น fatty acyl-CoA ที่ประกอบด้วย acyls-ACP ที่มีความยาวของคาร์บอนต่าง ๆ และมีจำนวนพันธะคู่ที่แตกต่างกัน จากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ triacylglycerol (TAG) (ภาพที่ 2.2.) ที่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ 1) ขั้นตอนการสังเคราะห์ diacylglycerol (DAG) โดยขั้นตอนนี้เริ่มจากการสังเคราะห์ lysophosphatidic acid (LPA) ซึ่งเป็นสารตัวกลางตั้งต้นในการสังเคราะห์ phosphatidic acid (PA) โดยเอนไซม์ G-3-P

acyltransferase เติมหมู่เอซิลให้แก่ glycerol-3-phosphate (Gly-3-P) ได้เป็น 1-acyl-G-3P (LPA) หรือโดยเอนไซม์ G-3-P acyltransferase เติมหมู่เอซิลให้แก่ dihydroxyacetone phosphate (DHAP) ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอน (Czabany และคณะ, 2007) จากนั้น LPA acyltransferase (LPAAT) จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่เอซิลให้แก่ LPA ได้เป็น PA ต่อมาเอนไซม์ phosphatidic acid phosphatase (PAP) จะทำหน้าที่เอาหมู่ฟอสเฟสออกจาก PA ได้เป็น diacylglycerol (DAG) และ 2 ขั้นตอนการสังเคราะห์ TAG จาก DAG โดยเอนไซม์ diacylglycerol acyltransferase (DGAT) ซึ่ง TAG ที่สังเคราะห์ได้ในเยื่อหุ้มเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum membrane) จะถูกเก็บในรูปของหยดน้ำมัน (oil droplet) ที่ห่อหุ้มด้วยฟอสโฟลิพิดโมโนเลเยอร์ (phospholipid monolayer) (Beopoulos และ Nicaud, 2012; Henne และคณะ, 2018) (ภาพที่ 2.5) โดยหยดน้ำมันที่ได้จากหลอมรวมกันเป็นหยดน้ำมันที่มีขนาดใหญ่ขึ้นภายในเซลล์ (Schuldiner และ Bohnert, 2017)



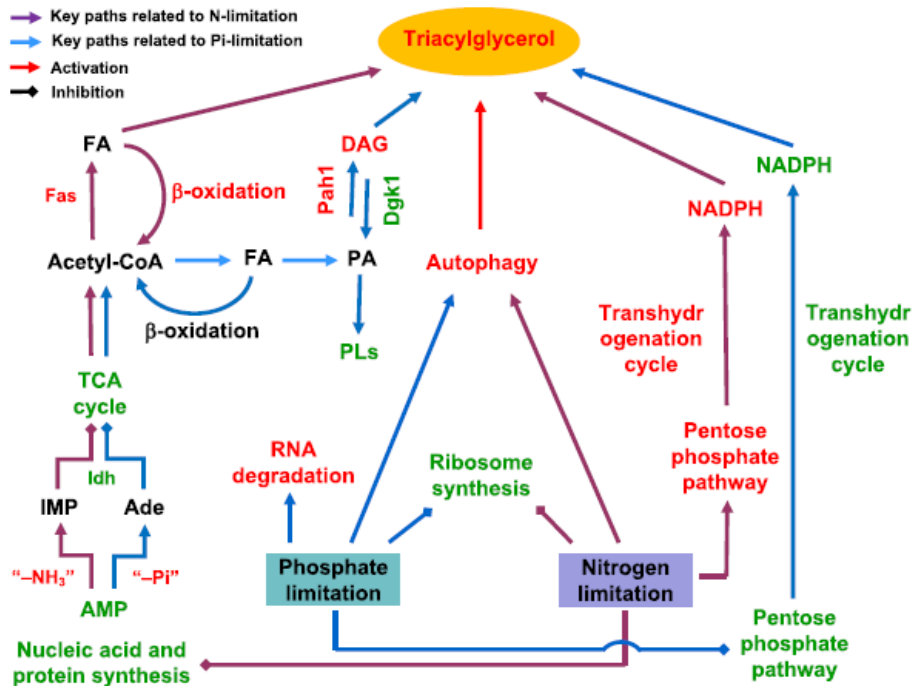
ภาพที่ 2.4 กลไกการสังเคราะห์กรดไขมัน (Balan, 2019)



ภาพที่ 2.5 การสร้างหยดน้ำมัน (Alberts และคณะ, 2008)

2.3.2 วิธีการสังเคราะห์และสะสมน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันภายใต้ภาวะที่มีฟอสฟอรัสจำกัด

กลไกการสังเคราะห์และสะสมน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันภายใต้ภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไปแต่มีฟอสฟอรัสจำกัด แสดงในภาพที่ 2.6 พบว่าในภาวะดังกล่าวนี้การเจริญของยีสต์ลดลง เนื่องจากการสังเคราะห์ไรโบโซมภายในเซลล์ถูกยับยั้ง มีการย่อยสลายอาร์เอ็นเอ (RNA) ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเพื่อดึงเอาหมู่ฟอสเฟตไปใช้เป็นแหล่งฟอสเฟตสำรองของเซลล์ ปริมาณ AMP (adenosine monophosphate) ภายในเซลล์ก็ลดลงเช่นกัน เนื่องจาก AMP ถูกเปลี่ยนไปเป็น adenosine (Ade) (Wang และคณะ, 2018b) ส่งผลให้การสังเคราะห์สารในวัฏจักรเครปส์ลดลง การลดลงของ AMP ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase (IDH) ในการเปลี่ยน isocitrate เป็น α -ketoglutarate ลดลง ส่งผลให้เกิดการสะสมของ citrate ในไมโทคอนเดรีย จากนั้น citrate จะถูกส่งออกไปยังไซโทพลาสซึม เพื่อเปลี่ยนไปเป็น acetyl-CoA และเข้าสู่วิธีการสังเคราะห์ TAG เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ TAG ในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัดดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น



ภาพที่ 2.6 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันในภาวะที่มีฟอสเฟตจำกัด (Wang และคณะ, 2018b)

2.4 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์อุตสาหกรรม

2.4.1 อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน

อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์อุตสาหกรรม (Zhu และคณะ, 2008) เนื่องจากการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์ถูกกระตุ้นเมื่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมด ในขณะที่ยังคั่งมีปริมาณคาร์บอนเหลืออยู่ (Ratledge, 2004) ยีสต์อุตสาหกรรมแต่ละสายพันธุ์มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันแตกต่างกัน (Sitepu และคณะ, 2014) พบว่าการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์อุตสาหกรรมจะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเพิ่มขึ้นถึงจุดหนึ่งเท่านั้น จากนั้นแม้ว่าอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนจะยังคงเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์จะลดลง (Sitepu และคณะ, 2014) Papanikolaou และ Aggelis (2011) รายงานว่าอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์อุตสาหกรรมควรมีค่ามากกว่า 20 อย่างไรก็ตามอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่เหมาะสมนั้นยังขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหารต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย (Beopoulos และคณะ, 2009) อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นนี้ส่งผลให้ปริมาณเซลล์ (cell biomass) ลดลง (Sitepu และคณะ, 2014) จึงอาจมีผลทำให้ผลผลิตน้ำมันลดลง Kraisintu

และคณะ (2010) รายงานว่าปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของ *R. toruloides* DMKU3-TK16 เพิ่มขึ้นจาก 25.84 เป็น 62.30 % (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเพิ่มจาก 65 เป็น 140 แต่ปริมาณเซลล์ที่ได้ลดลง 35.46% ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากการเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนต่อการผลิตน้ำมันของ *Trichosporon cutaneum* CH002 ที่พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเป็น 180 ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 47.1% แต่อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่สูงกว่า 100 ทำให้เซลล์และผลผลิตน้ำมันของ *T. cutaneum* CH002 ลดลง ด้วยเหตุนี้อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของ *T. cutaneum* CH002 จึงเท่ากับ 100 (Chen และคณะ, 2013) การเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Trichosporon fermentans* CICC 1368 เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 63.1% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเท่ากับ 140 แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนสูงขึ้นเป็น 248 พบว่าปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมันลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้แรงดันออสโมติกของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น นอกจากนั้นผลจากการใช้น้ำตาลกลูโคสที่มากเกินไปของยีสต์ ยังอาจส่งผลให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดต่ำลง การเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์จึงลดลง (Zhu และคณะ, 2008)

2.4.2 ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์อุตสาหกรรม เนื่องจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการเมแทบอลิซึมน้ำตาลแตกต่างกัน รวมทั้งมีกลไกในการสังเคราะห์น้ำมันจากน้ำตาลแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย *Rhodotorula minuta* IIP-33 ผลิตน้ำมันในอาหารจำกัดปริมาณไนโตรเจนที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันต่างกัน โดยพบว่าให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส รองลงมา คือ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลกาแลกโตส (Saxena และคณะ, 1998) สอดคล้องกับรายงานของ Chen และคณะ (2013) ที่พบว่า *T. cutaneum* CH002 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 52.0% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเจริญในอาหารจำกัดไนโตรเจนที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่มีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 24.1 กรัม/ลิตร เมื่อเจริญในอาหารชนิดเดียวกันที่มีน้ำตาลเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้ *T. cutaneum* CH002 มีปริมาณผลผลิตน้ำมันในอาหารทั้งสองชนิดนี้ใกล้เคียงกัน Zhu และคณะ (2008) รายงานผลการศึกษากการผลิตน้ำมันของ *T. fermentans* CICC1368 ในอาหารจำกัดปริมาณไนโตรเจนที่แปรผันแหล่งคาร์บอน 5 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลแลกโตส และน้ำตาลฟรุคโตส พบว่า *T. fermentans* CICC1368 มีปริมาณเซลล์และผลผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 24.1 กรัม/ลิตร และ 13.6

กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่มีปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์เพียง 56.6% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) น้อยกว่าเมื่อเจริญในอาหารจำกัดปริมาณไนโตรเจนที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เท่ากับ 62.6% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์อุดมน้ำมันหลายสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรไลเสตของลิกโนเซลลูโลสได้ ซึ่งไฮโดรเสตลิกโนเซลลูโลสโดยทั่วไปประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิดหลัก คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส การผลิตและสะสมน้ำมันของ *R. toruloides* CBS14 เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed-batch cultivation) ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสผสมกับน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (Wiebe และคณะ, 2012) *Rhodotorula taiwanensis* DMKU-RK185 เจริญและผลิตน้ำมันในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส อัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน จะเจริญและผลิตน้ำมันได้ใกล้เคียงกับในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว (Poontawee และคณะ, 2017)

Amaretti และคณะ (2010) รายงานว่าการผลิตน้ำมันของ *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้น โดยให้ผลผลิตน้ำมันและมีปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 19 กรัม/ลิตร และ 68% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 120 กรัม/ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kraisintu และคณะ (2010) ที่พบว่าปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์และผลผลิตน้ำมันของ *R. toruloides* DMKU13-TK16 เพิ่มขึ้นจาก 52.01% เป็น 64.43% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 4.78 กรัม/ลิตร และ 8.11 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัดเพิ่มขึ้นจาก 30 กรัม/ลิตร เป็น 70 กรัม/ลิตร และปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 9.22 กรัม/ลิตร เป็น 13.56 กรัม/ลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นเป็น 90 กรัม/ลิตร ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ ผลผลิตน้ำมันและปริมาณเซลล์ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากแรงดันออสโมติกในอาหารผลิตน้ำมันที่สูงขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้น (Patel และคณะ, 2016)

2.4.3 ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ (Zhu และคณะ, 2008; Sitepu และคณะ, 2014) Chen และคณะ (2013) รายงานว่าการเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย เพปโทน แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ หรือ ทรีปโทน ลงในอาหารไฮโดรไลเสต ชั่งข้าวโพด ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *T. cutaneum* ในขณะที่ Evans และ Ratledge (1984) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอสพาราจिन และกลูตาเมต ต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมัน 17 สปีชีส์ ในอาหารที่มีกลูโคส 30 กรัม/ลิตร แต่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด พบว่าแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดส่งผลต่อปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของยีสต์แต่ละสปีชีส์ต่างกัน และพบว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ ยูเรีย อาร์จินิน หรือ แอสพาราจिन แทนแอมโมเนียมคลอไรด์ซึ่งเป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ในอาหารผลิตน้ำมัน ทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของ *R. toruloides* CBS14 เพิ่มขึ้นจากเดิม 18% เป็น 51% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง)

Tsigie และคณะ (2011) รายงานว่า *Yarrowia lipolytica* Po1g ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตขานอ้อยที่เติมเพปโทน ให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตขานอ้อยที่เติมแอมโมเนียมไนเตรตซึ่งเป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ 43.17% สอดคล้องกับ Zhu และคณะ (2008) ที่พบว่าการเติมไนโตรเจนอินทรีย์ คือ ยูเรีย หรือ เพปโทน ในอาหารผลิตน้ำมัน ส่งผลให้ *T. fermentans* เจริญเร็วกว่าและมีปริมาณเซลล์สูงกว่าเมื่อเติมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ แอมโมเนียมไนเตรตซึ่งเป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือ กรดไนตริก (HNO_3) ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมไนโตรเจนอนินทรีย์ มีผลไปยังการเจริญของยีสต์

2.4.4 แร่ธาตุและวิตามิน

แร่ธาตุและวิตามินบางชนิดจำเป็นต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ (Spencer และ Spencer, 2013) การเติมแร่ธาตุบางชนิดความเข้มข้นต่ำ ๆ ลงในอาหารผลิตน้ำมันพบว่ามีส่วนทำให้การเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันหลายสายพันธุ์เพิ่มขึ้น (Zhao และคณะ, 2008; Zhu และคณะ, 2008) ทั้งนี้อาจเนื่องจากแร่ธาตุบางชนิด เช่น แมกนีเซียม โพแทสเซียม และแคลเซียม มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์หลักในกระบวนการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์ (Jernejc และ Legiša, 2002) Chen และคณะ (2013) รายงานว่าการเติม แมกนีเซียม คอปเปอร์ แมงกานีส หรือ โพแทสเซียม ลงในไฮโดรไลเสตชั่งข้าวโพด มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ *T. cutaneum* CH002 ต่างกัน โดยพบว่าแมกนีเซียมและโพแทสเซียม ทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของ *T. cutaneum* CH002 ที่เจริญในอาหารไฮโดรไลเสตชั่งข้าวโพดที่ไม่เติม

แร่ธาตุ เพิ่มขึ้นจากเดิม 35% เป็น 40% และ 45% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ ในขณะที่ คอปเปอร์ทำให้ปริมาณเซลล์ เพิ่มขึ้น 3.6% ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์นี้ส่งผลให้ผลผลิตน้ำมัน เพิ่มขึ้นด้วย

อย่างไรก็ตามพบว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีคาร์บอนมากแต่มีปริมาณแร่ธาตุ บางชนิด เช่น ฟอสฟอรัส หรือ ซัลเฟอร์จำกัด (Wu และคณะ, 2010; Wu และคณะ, 2011) สามารถ กระตุ้นให้ยีสต์ผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ได้เช่นกัน Wu และคณะ (2010) รายงานว่าการผลิต น้ำมันของ *R. toruloides* Y4 เพิ่มขึ้นเป็น 62.2% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเจริญในอาหารที่มี ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนสูง แต่มีปริมาณฟอสฟอรัสจำกัด โดยอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เท่ากับ 9,552 Huang และคณะ (2018) รายงานว่าปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของ *Cryptococcus curvatus* MUCL 29819 เมื่อเจริญในอาหารที่มีคาร์บอนและไนโตรเจนสูง แต่มีปริมาณฟอสฟอรัส จำกัด (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเท่ากับ 1482) สูงกว่าเมื่อเจริญในอาหารชนิดเดียวกัน แต่ ปริมาณฟอสฟอรัสสูง 39.60% Wu และคณะ (2011) พบว่าเมื่อเลี้ยง *R. toruloides* Y4 ในอาหารที่มี คาร์บอนและไนโตรเจนสูง แต่มีปริมาณซัลเฟตจำกัด (อัตราส่วนคาร์บอน/ซัลเฟต เท่ากับ 46,750) มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ 58.3% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิด เดียวกันที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ซัลเฟต เท่ากับ 150 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เพียง 20.8% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง)

Haskell และ Snell (1965) รายงานว่าการขาดวิตามินบี 6 ทำให้การผลิตน้ำมัน ของ *Hanseniaspora valbyensis* ลดลง โดยปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ลดลงถึง 40% เมื่อเทียบ กับการผลิตน้ำมันในอาหารที่มีการเติมวิตามิน และทำให้ปริมาณกรดไขมันพาล์มิโตเลอิกในน้ำมันที่ ผลิตได้ลดลงด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอาหารผลิตน้ำมันมีผลทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของ *Candida albicans* เพิ่มขึ้นจาก 0.32% เป็น 6.29% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) (Ratray และคณะ, 1975)

2.4.5 พีเอช

โดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ที่พีเอชช่วงกว้าง แต่จะเจริญได้ดีที่พีเอชช่วง 3 ถึง 7 ยีสต์แต่ ละสายพันธุ์มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน (Ratray และคณะ, 1975) โดยพีเอชที่ เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันมักต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ Angerbauer และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Lipomyces starkeyi* ในอาหารที่มีกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสีย เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมัน เท่ากับ 5.0 ในขณะที่พีเอชที่เหมาะสม ต่อการเจริญเท่ากับ 6.5 การที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันอยู่ในช่วงเป็นกรดเป็นผลดีต่อ การผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากช่วยลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการผลิต

(Sitepu และคณะ, 2014) Johnson และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตน้ำมันของ *Rhodotorula glutinis* IIP-30 โดยการเลี้ยงแบบกึ่งกะ ในอาหารเหลวกลูโคสที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัดแล้วแปรผันพีเอชเป็น 3, 4, 5 และ 6 พบว่าที่พีเอช 4.0 ให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุด โดยมีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เท่ากับ 66% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง)

พริตา โชคเหรียญสุขชัย (2561) รายงานการผลิตน้ำมันของ *Pseudozyma tsukubaensis* YWT7-2 ในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5, 5.5 และ 6 พบว่าพีเอช 5.5 เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมัน

Kraisintu และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตน้ำมันของ *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16 ที่พีเอช 5, 5.5, 6 และ 6.5 พบว่า *R. toruloides* DMKU3-TK16 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุด 71.3% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่พีเอช 5.5

นอกจากนี้ยังมียีสต์อุดมน้ำมันอีกหลายสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันเท่ากับ 5.5 ได้แก่ *Cryptococcus curvatus* (El-Fadaly และคณะ, 2009) *Rhodospiridium kratochilovae* SY89 (Jiru และคณะ, 2017) และ *Rh. glutinis* ที่ผลิตน้ำมันเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำเสียจากการผลิตผงชูรส (Xue และคณะ, 2008)

Pranimit และคณะ (2019) รายงานว่า *Candida* sp. NG17 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 21% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่พีเอช 6.5

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพีเอชช่วง 3 ถึง 10 ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *R. toruloides* Y4 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YEPD (Li และคณะ, 2006)

2.4.6 อุดมไขมัน

ยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีอุดมไขมันที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน แต่อุดมไขมันที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส การผลิตน้ำมันของยีสต์ที่อุดมไขมันสูงหรือต่ำเกินไป มีผลต่อการเจริญและการสะสมน้ำมัน Kates และ Paradis (1973) รายงานว่าการลดอุดมไขมันในขั้นตอนการผลิตน้ำมันของ *Yarrowia lipolytica* ให้ต่ำกว่าอุดมไขมันที่เหมาะสมต่อการเจริญทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์สูงขึ้น แต่การผลิตน้ำมันของยีสต์ที่อุดมไขมันต่ำไม่คุ้มทุนในระดับอุตสาหกรรม

นอกจากนี้อุดมไขมันสูงมีผลต่อกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน เนื่องจากกรดไขมันแต่ละชนิดมีจุดหลอมเหลวแตกต่างกัน การลดอุดมไขมันลงจะทำให้ปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น เพราะจุดหลอมเหลวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำกว่าของกรดไขมันอิ่มตัว และปริมาณกรดไขมันสายสั้นอาจเพิ่มขึ้นเพราะจุดหลอมเหลวของกรดไขมันสายสั้นต่ำกว่าของกรดไขมันสายยาว

โดยพบว่าเมื่อลดอุณหภูมิในขั้นตอนการผลิตน้ำมันลงจาก 25 องศาเซลเซียส เป็น 10 องศาเซลเซียส นอกจากส่งผลให้ *Y. lipolytica* มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เพิ่มขึ้น ยังทำให้ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นด้วย (Ratray และคณะ, 1975)

2.4.7 การให้อากาศ

การให้อากาศเป็นหนึ่งในภาวะการเพาะเลี้ยงยีสต์อุตสาหกรรมน้ำมันที่สำคัญ เพราะมีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมัน การให้อากาศช่วยให้ยีสต์อุตสาหกรรมน้ำมันมีปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์เพิ่มขึ้น (Woodbine, 1959) แต่ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการให้อากาศเพิ่มขึ้น (Sitepu และคณะ, 2014) Choi และคณะ (1982) รายงานว่าการเพิ่มการให้อากาศแก่ *R. toruloides* ทำให้อัตราการเจริญเร็วขึ้น แต่อัตราการผลิตน้ำมันไม่เพิ่มขึ้น โดยมีค่าคงที่เท่ากับ 0.012 กรัมไขมัน/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง/ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องจากความต้องการออกซิเจนของ *R. toruloides* สูงขึ้นเพียงช่วงหนึ่งเมื่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมด จากนั้นความต้องการออกซิเจนก็จะลดลง (Turcotte และ Kosaric, 1989)

นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีผลต่อชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่ยีสต์ผลิต โดยพบว่าภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจำกัด กรดไขมันอิ่มตัวถูกสังเคราะห์มาก แต่ภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอต่อการเจริญ การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะเพิ่มขึ้น เพราะยีสต์ต้องการกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อการเจริญ (Babji และคณะ, 1969; Valero และคณะ, 2001)

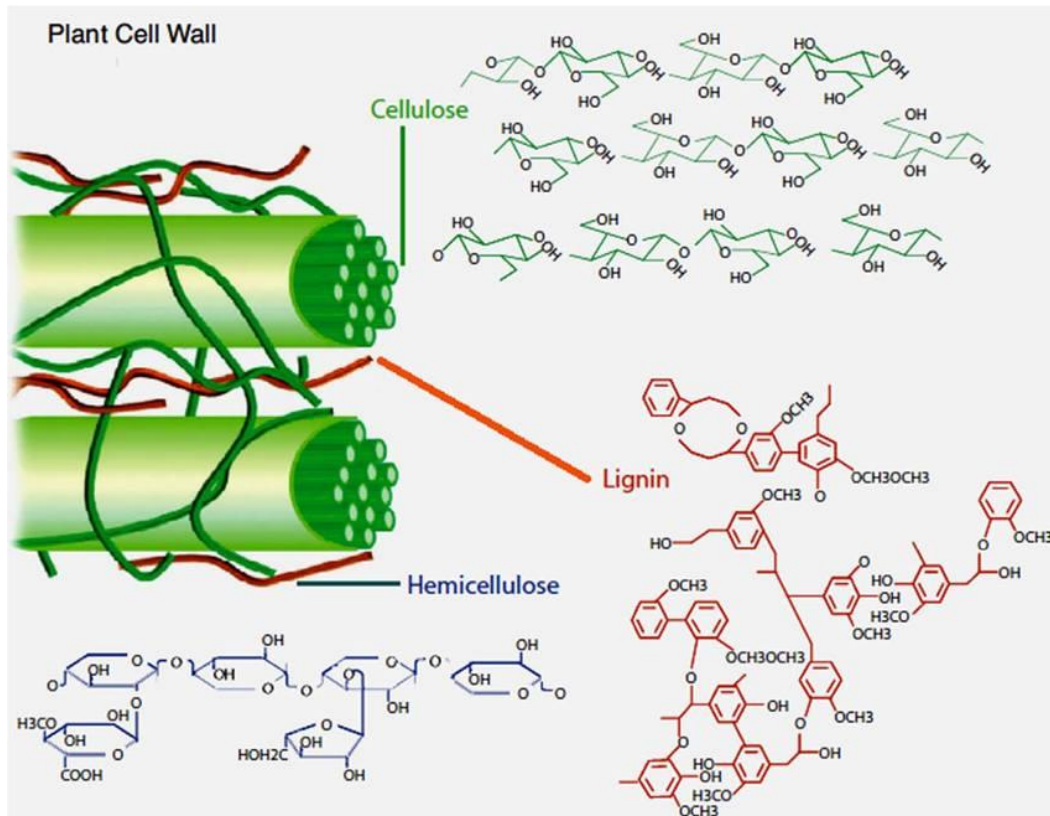
2.5 ลิกโนเซลลูโลสและการเตรียมไฮโดรไลเสต

2.5.1 ลิกโนเซลลูโลสและการผลิตน้ำมันยีสต์

โดยทั่วไปการศึกษาการผลิตน้ำมันยีสต์นิยมใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากยีสต์ทุกชนิดสามารถใช้ได้ แต่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม การใช้น้ำตาลกลูโคสต้นทุนการผลิตจะสูง ไม่คุ้มทุน จึงมุ่งเน้นหาแหล่งคาร์บอนอื่นที่ยีสต์ใช้ได้และราคาถูก วัตถุดิบจำพวกแป้งและน้ำตาล เช่น อ้อย กากน้ำตาล แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน แต่เนื่องจากวัตถุดิบกลุ่มนี้เป็นพืชอาหารและเป็นที่ต้องการของหลายอุตสาหกรรม จึงอาจทำให้ราคาของพืชอาหารเหล่านี้สูงขึ้นและขาดแคลนได้ในอนาคต วัตถุดิบกลุ่มลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟาง ข้าว ชานอ้อย ใบอ้อย ใบและชังข้าวโพด กากมันสำปะหลัง หญ้า และเศษไม้ จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะเป็นของเหลือทิ้งจากภาคการเกษตรและภาคอุตสาหกรรม ราคาถูก และมีปริมาณมากพอต่อความต้องการ นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรไลเสตลิกโนเซลลูโลสได้

ลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของพืช มีโครงสร้างเป็นเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) (ภาพที่ 2.7) โดยองค์ประกอบทั้งหมดนี้จะยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอวาลส์ (van der waals) จึงทำให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรง ทั้งนี้ปริมาณขององค์ประกอบแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับชนิดของลิกโนเซลลูโลส (ตารางที่ 2.4)

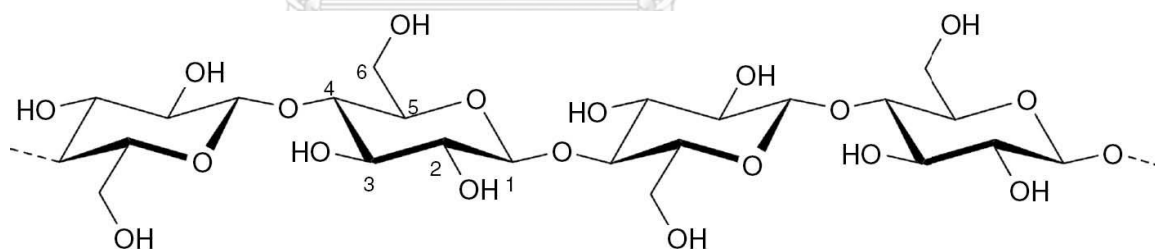
เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดในลิกโนเซลลูโลส สูตรโมเลกุล คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ โครงสร้างเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ประเภทโฮโมจีเนียส (homogeneous polysaccharide) คือ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เพียงชนิดเดียว คือ น้ำตาลกลูโคส เรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic อย่างเป็นระเบียบไม่มีแขนงย่อย (ภาพที่ 2.8) จำนวนหน่วยของน้ำตาลกลูโคสที่พบในเซลลูโลสธรรมชาติอาจสูงถึง 15,000 โมเลกุล (Jönsson และ Martin, 2016) นอกจากนี้พบมีหน่วยย่อย คือ เซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 หน่วยเรียงต่อกัน (ภาพที่ 2.9) เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่ให้ความแข็งแรงแก่พืช เพราะโครงสร้างมีความแข็งแรง โดยทุก ๆ หน่วยที่สองของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสที่เรียงต่อกันสามารถหมุนได้ 180 องศา จึงสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ในโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสกับออกซิเจนของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสถัดไป (intra molecule H-bond) และสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อระหว่างสายของพอลิเมอร์ที่ขนานกัน (inter molecule H-bond) (ภาพที่ 2.10) การศึกษาเส้นใยของเซลลูโลส (cellulose fibril) พบว่าประกอบด้วย 2 ส่วน คือ เซลลูโลสผลึก (crystalline cellulose) ส่วนนี้สายเซลลูโลสเรียงตัวขนานกันอย่างมีระเบียบ และเซลลูโลสอสัณฐาน (amorphous cellulose) ส่วนนี้สายเซลลูโลสเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (Fengel และ Wegener, 2011) เซลลูโลสไม่ละลายในน้ำ สารละลายอินทรีย์ และต่างอ่อน (Eo และคณะ, 2016) แต่สามารถละลายได้ดีในกรดและด่างแก่



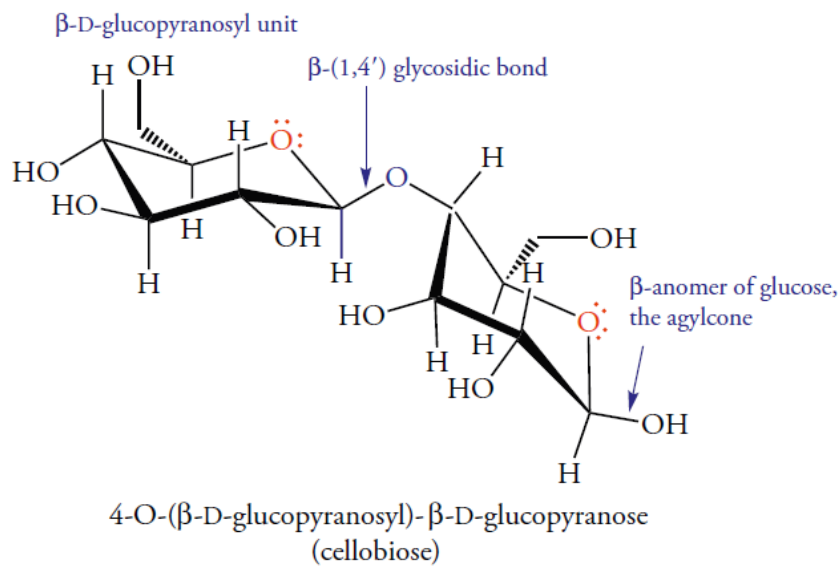
ภาพที่ 2.7 โครงสร้างลิกโนเซลลูโลสในเซลล์พืช (Bamdad และคณะ, 2018)

ตารางที่ 2.4 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในลิกโนเซลลูโลสชนิดต่าง ๆ

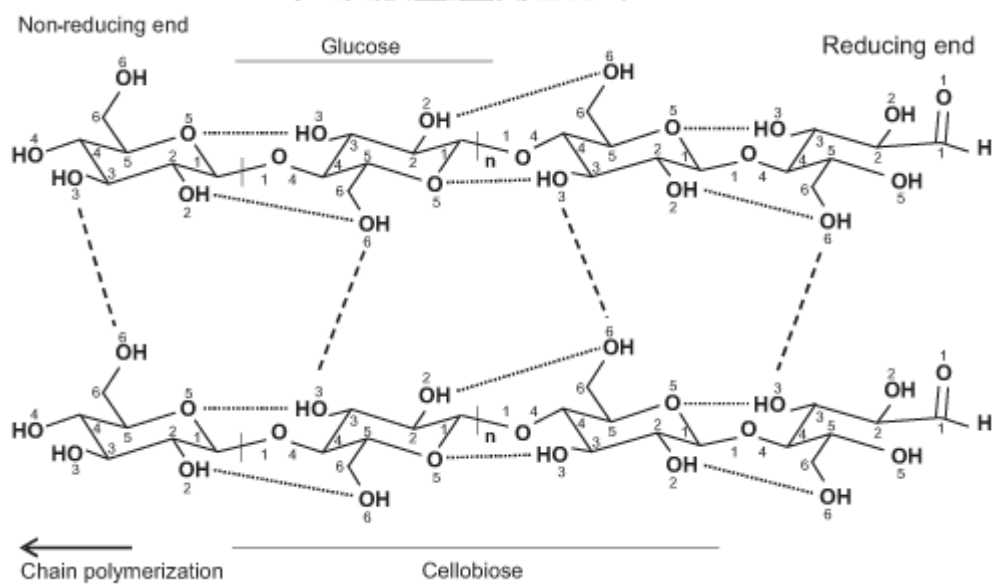
ลิกโนเซลลูโลส	องค์ประกอบทางเคมี (%)			ที่มา
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	
ฟางข้าว	32.15	28.0	19.64	Shawky และคณะ (2011)
ฟางข้าวสาลี	36.7	26.4	12.5	Yu และคณะ (2011)
ชานอ้อย	49.5	24.3	22.7	Xavier และคณะ (2017)
ยอดอ้อย	42.7	25.5	5.8	Poontawee และคณะ (2018)
ใบอ้อย	38.5	23.0	15.6	Jutakanoke และคณะ (2012)
ซังข้าวโพด	41.05	31.39	6.34	Wang และคณะ (2019)
ต้นข้าวโพด	29.80	33.30	16.65	Shawky และคณะ (2011)
หญ้าเนเปียร์	41.8	23.2	25.0	Tsai และคณะ (2018)
ทะลายปาล์ม	47.9	16.8	18.3	Weeraphan และคณะ (2016)



ภาพที่ 2.8 ลักษณะการจัดเรียงตัวของสายโพลีเมอร์น้ำตาลกลูโคสในเซลลูโลส (Jedvert และ Heinze, 2017)

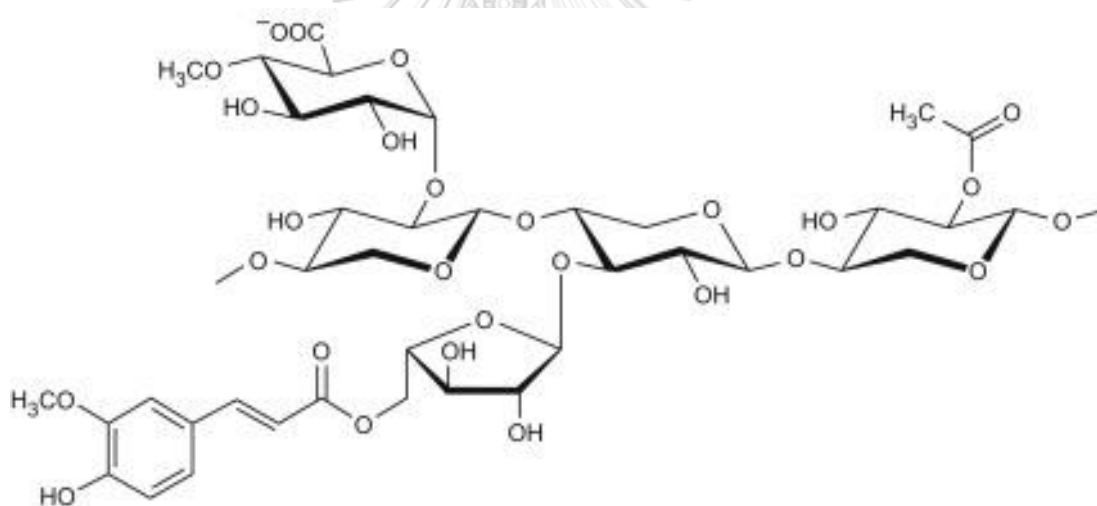


ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของเซลโลไบโอส (Ouellette และ Rawn, 2015)



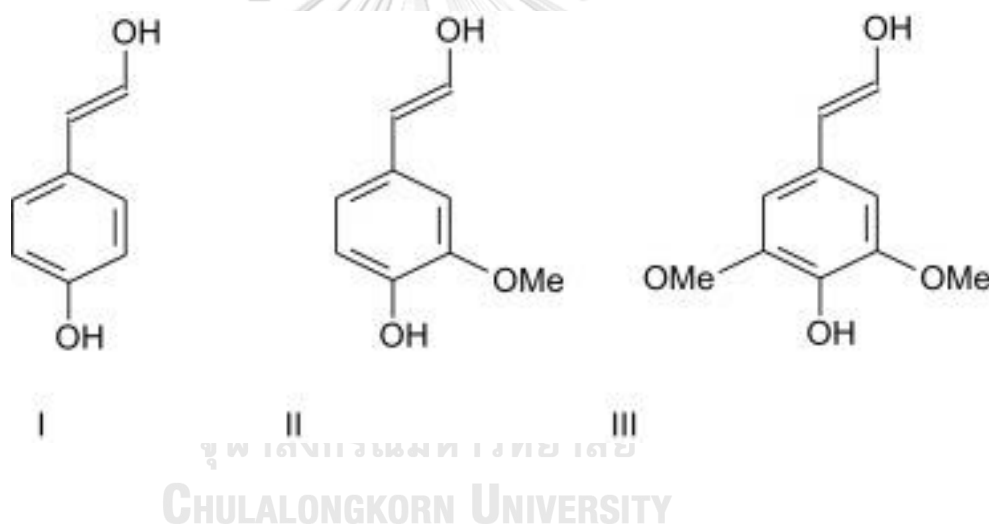
ภาพที่ 2.10 โครงสร้างและรูปแบบการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสภายในสายพอลิเมอร์ (เส้นจุดไข่มุก) และระหว่างสายพอลิเมอร์ของเซลลูโลส (เส้นประ) (Festucci-Buselli และคณะ, 2007)

เฮมิเซลลูโลส สูตรโมเลกุล คือ $[C_5(H_2O)_4]_n$ หรือ $[C_6(H_2O)_5]_n$ เป็นสารประกอบโพลีแซ็กคาไรด์ประเภทเฮเทอโรจีเนียส (heterogenous polysaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลเพนโทส (น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลอะราบิโนส) น้ำตาลเฮกโซส (น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแล็กโทส และน้ำตาลแมนโนส) และน้ำตาลดีออกซีเฮกโซส (น้ำตาล แรมโนสและน้ำตาลฟูโคส) รวมทั้งกรดเฮ็กซูโรนิก (hexuronic acid) ได้แก่ กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และ กรดกาแล็กทูโรนิก (galacturonic acid) (Bobleter, 1994; Saha, 2003) โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสเป็นแบบเรียงตัวต่อกันเป็นสายโซ่ที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาดังแสดงในภาพที่ 2.11 เฮมิเซลลูโลสมีมวลโมเลกุลและค่าระดับการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization) ต่ำกว่าเซลลูโลส โดยพบว่ามื่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเรียงตัวต่อกันเพียงประมาณ 50-200 โมเลกุล น้อยกว่าที่พบในเซลลูโลส (Bobleter, 1994) จึงทำให้เฮมิเซลลูโลสถูกย่อยเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ง่ายกว่าเซลลูโลส (Machmudah และคณะ, 2017)



ภาพที่ 2.11 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Machmudah และคณะ, 2017)

ลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสูตรโมเลกุล คือ $(C_{10}H_{12}O_4)_n$ น้ำหนักโมเลกุลสูง โมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนที่รวมกันเป็นหน่วยย่อย เป็นโพลิเมอร์เพียงชนิดเดียวของลิกโนเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเป็นแบบแอโรแมติก (aromatic) (Bobleter, 1994) โดยมีแอลกอฮอล์ 3 ชนิดเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน คือ พาราคูมาริลแอลกอฮอล์ (*p*-coumaryl alcohol) โคนิฟิрилแอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และซินาพิลแอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol) ดังแสดงในภาพที่ 2.12 พืชต่างชนิดกันจะมีปริมาณองค์ประกอบแต่ละชนิดต่างกัน เช่น ไม้เนื้ออ่อน มี coniferyl alcohol มากที่สุด ในขณะที่ไม้เนื้อแข็งมีทั้ง coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol มาก เป็นต้น (Zheng และคณะ, 2019) ลิกนินมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ไม่ยืดหยุ่นจึงทำให้น้ำเชื่อมเยื่อพืชแข็งเป็นตัวเชื่อมระหว่างเส้นใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นพืชที่มีปริมาณลิกนินเป็นองค์ประกอบสูงจึงมีความแข็งแรงทนทานสูง



ภาพที่ 2.12 องค์ประกอบพื้นฐานของลิกนิน I: *p*-coumaryl alcohol; II: coniferyl alcohol; III: sinapyl alcohol (Huang และคณะ, 2019)

2.5.2 การเตรียมไฮโดรไลเสต

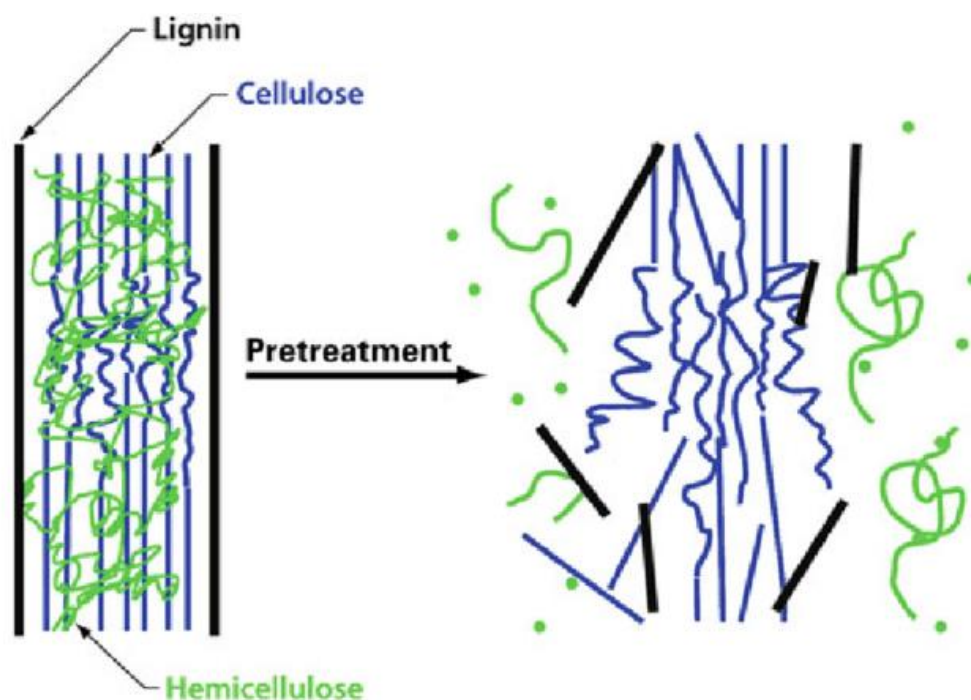
ไฮโดรไลเสตจากลิกโนเซลลูโลสหลายชนิด เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชานข้าวฟ่าง หวาน ใบอ้อย และซังข้าวโพด ได้ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตน้ำมันของยีสต์หลายสายพันธุ์ (ตารางที่ 2.5) เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสมีข้อจำกัดทางกายภาพและทางเคมี จุลินทรีย์จึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรง ต้องนำมาย่อยให้เป็นน้ำตาลหน่วยย่อยหรือเรียกว่าไฮโดรไลเสตก่อน โดยชนิดของน้ำตาลที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของโพลีเมอร์ที่เป็น องค์ประกอบในลิกโนเซลลูโลส เซลลูโลสที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว แต่ถ้าย่อยเซลลูโลสไม่สมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส และกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์ (gluco-oligosaccharide) ส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อถูกย่อยจะได้น้ำตาลหลายชนิดปนกัน การย่อยลิกโนเซลลูโลสมี 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี เช่น การใช้กรดแก่ กรดอ่อน หรือด่าง และ วิธีทางชีวภาพ โดยการใช้เอนไซม์ ซึ่งวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นที่นิยมมากกว่าเพราะภาวะที่ใช้ไม่รุนแรง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไม่ถูกเปลี่ยนเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญหรือเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถทำการหมักไปพร้อม ๆ กับการย่อยลิกโนเซลลูโลสได้ เรียกกระบวนการนี้ว่า SSF (simultaneous saccharification and fermentation) อย่างไรก็ตามการย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์มีข้อจำกัดคือ เอนไซม์ไม่สามารถเข้าถึงเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ง่าย เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสถูกปกคลุมด้วยลิกนิน นอกจากนี้เซลลูโลสก็ยังมีส่วนที่โครงสร้างเป็นผลึก (crystalline region) ทนต่อการย่อย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับสภาพ (pretreatment) ลิกโนเซลลูโลสก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อกำจัดลิกนินและเพื่อให้โครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอยู่ในสภาพที่เหมาะสม เพิ่มการเข้าถึงของเอนไซม์ที่จะทำหน้าที่ย่อย (ภาพที่ 2.13) ซึ่งวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมต่อลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิด จะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่เป็นองค์ประกอบในลิกโนเซลลูโลสนั้น ๆ ดังนั้นจึงควรเลือกวิธีการปรับสภาพให้เหมาะสมกับชนิดของลิกโนเซลลูโลส โดยวิธีการปรับสภาพแบ่งออกเป็น 4 วิธีการหลัก ๆ ดังนี้

ตารางที่ 2.5 การผลิตน้ำมันยีสต์โดยใช้ไฮโดรไลซิสเอนไซม์ในเซลล์ยีสต์เป็นสับสเตรต

ยีสต์	วัตถุดิบ	การย่อย	การกำจัดสารพิษ	ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ (% , น้ำหนัก/น้ำหนัก)	ปริมาณเซลล์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)	อ้างอิง
<i>Trichosporon fermentans</i> CICC 1368	ฟางข้าว	กรดซัลฟิวริกเจือจาง และน้ำความดันไอ 121°C, 15 นาที	ปรับต่างเกิน ระเหย สูญญากาศ และดูดซับ ด้วยเรซิน	40.1	28.6	11.5	Huang และ คณะ (2009)
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	ฟางข้าวสาลี	กรดซัลฟิวริกเจือจาง และน้ำความดันไอ 121°C, 15 นาที	-	33.5	17.2	6.02	Yu และคณะ (2011)
<i>Cr. curvatus</i> ATCC 20509	ฟางข้าวสาลี	กรดซัลฟิวริกเจือจาง และน้ำความดันไอ 121°C, 15 นาที	ปรับต่างเกิน	27.1	15.6	4.23	(Yu และคณะ, 2011)
<i>T. fermentans</i> HWZ 004	ฟางข้าว	กรดเจือจาง	-	52.2	26.4	13.78	Li และคณะ (2011)
<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1g	ชาน้อย	กรดไฮโดรคลอริก	ปรับต่างเกิน ด้วย Ca(OH) ₂	58.5	11.42	6.68	Tsigie และ คณะ (2011)

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

ยีสต์	วัสดุตั้ง	การย่อย	การกำจัดสารพิษ	ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ (% , น้ำหนัก/น้ำหนัก)	ปริมาณเซลล์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)	อ้างอิง
<i>Cr. curvatus</i> ATCC 20509	ชั่งข้าวฟ่างหวาน	ไมโครเวฟ	-	63.98	15.50	9.92	Liang และคณะ (2012)
<i>Trichosporon cutaneum</i> CH002	ชั่งข้าวโพด	กรด	ปรับค่า pH และดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์	45.4	22.9		Chen และคณะ (2013)
<i>Cryptococcus</i> sp. SM5S05	ชั่งข้าวโพด	กรดซัลฟิวริกเจือจางและน้ำความดันไอ 121°C, 15 นาที	-	61.3	10.8	6.6	Chang และคณะ (2013)
<i>Trichosporon dermatitis</i> CH007	ชั่งข้าวโพด	เอนไซม์	-	40.1	24.4	9.78	Huang และคณะ (2012)
<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271	ชั่งข้าวโพด	กรด	-	32.0	38.4	12.3	Gao และคณะ (2014)
<i>Trichosporon coremijiforme</i> CH005	ชั่งข้าวโพด	กรดซัลฟิวริกเจือจาง	-	37.8	20.4	7.7	Huang และคณะ (2013)



ภาพที่ 2.13 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสและผลของการปรับสภาพ (Ji และคณะ, 2011)

1) วิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) โดยการบดหรือตัดลิกโนเซลลูโลสให้มีขนาดเล็กลง เพื่อลดผลึกและเพิ่มพื้นที่ผิวให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น หรือโดยการให้ความร้อนสูงร่วมกับแรงดันสูง เพื่อทำให้โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสแตกออก เรียกวิธีนี้ว่า steam explosion

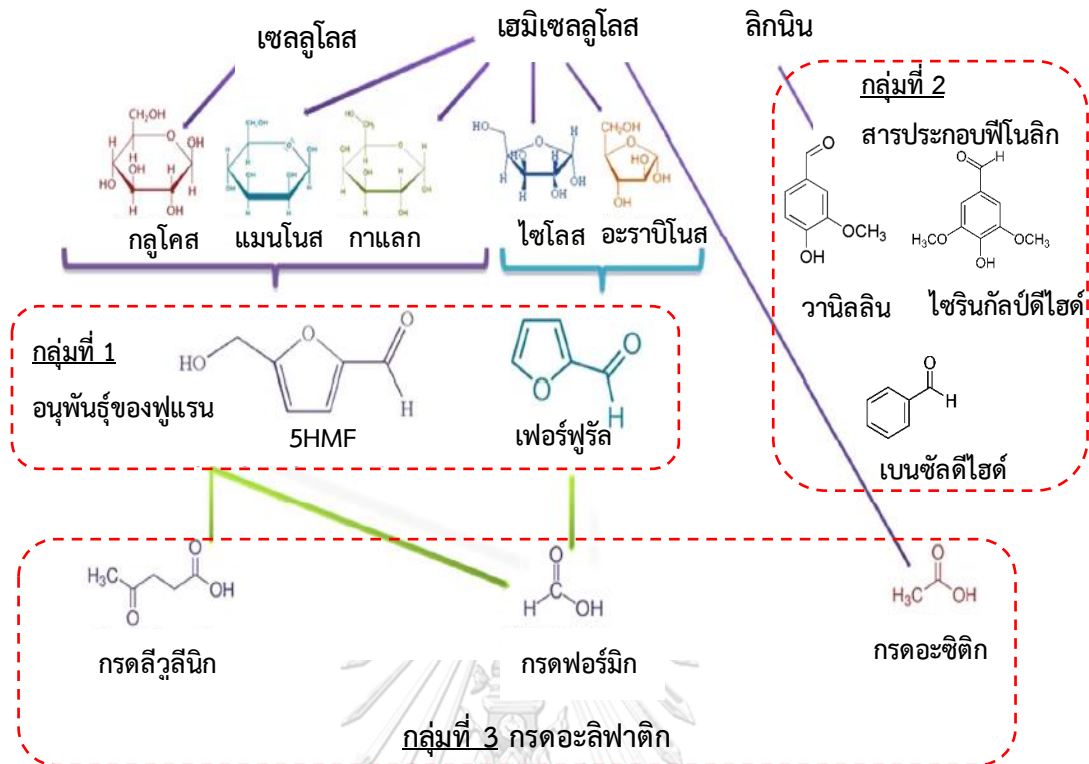
2) วิธีทางเคมี (chemical pretreatment) โดยการใช้กรดหรือด่าง นิยมใช้กรดอินทรีย์มากกว่ากรดอนินทรีย์ กรดอินทรีย์ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ กรดซัลฟิวริกเจือจาง เนื่องจากทำให้ได้เซลลูโลสที่มีโครงสร้างหลังการปรับสภาพที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ง่ายที่สุด และของเหลวที่ได้หลังการปรับสภาพ มีปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสสูง (Jönsson และ Martín, 2016) ต่างที่นิยมใช้ในการปรับสภาพ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Kim และคณะ, 2008) ต่างจะทำให้ลิกโนเซลลูโลสมีความพรุนมากขึ้น ทั้งนี้เพราะเกิดการบวมพองภายในโมเลกุล โครงสร้างผลึกของเซลลูโลสลดลง เอนไซม์จึงสามารถเข้าถึงได้ง่าย และยังทำลายโครงสร้างของลิกนิน วิธีนี้ใช้เป็นวิธีการกำจัดลิกนินออกจากลิกโนเซลลูโลสที่มีปริมาณลิกนินสูง

3) วิธีทางกายภาพร่วมกับเคมี (physiochemical pretreatment) วิธีนี้ใช้กรดหรือด่างร่วมกับวิธีทางกายภาพต่าง ๆ เช่น วิธีการใช้กรดร่วมกับ steam explosion (Jönsson และ Martín,

2016) วิธี ammonia recycled percolation (Iyer และคณะ, 1996) และวิธี ammonia fiber expansion (Sundaram และคณะ, 2015) เป็นต้น

4) วิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment) วิธีนี้ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ หรือใช้จุลินทรีย์โดยตรง เช่น white-rot fungi (Jönsson และคณะ, 1998) เป็นวิธีการปรับสภาพที่ปฏิกิริยาไม่รุนแรง มีความปลอดภัย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่ยังไม่เป็นที่ยอมรับในระดับอุตสาหกรรม เพราะใช้เวลานาน และมีราคาแพง

วิธีการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสโดยมากจะใช้ภาวะที่รุนแรงทั้งจากอุณหภูมิ พีเอช และแรงดัน จึงอาจก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ได้ (by-product) เป็นสารประกอบที่มีความเป็นพิษ (toxic compound) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (growth inhibitor) (ภาพที่ 2.14) ชนิดของสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่พบในไฮโดรไลเสตลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโพลีเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสและวิธีการปรับสภาพที่ใช้ (Jönsson และคณะ, 2013) ชนิดของสารยับยั้งการเจริญแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก กลุ่มแรก เป็นสารในกลุ่มอนุพันธ์ของฟูแรน (furan derivative) ได้แก่ เฟอร์ฟูรัล (furfural) และ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) ซึ่งพบได้บ่อยในไฮโดรไลเสตลิกโนเซลลูโลส เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลเพนโตสและน้ำตาลเฮกโซส กลุ่มที่ 2 เป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เกิดจากการปรับสภาพภายใต้ภาวะที่เป็นกรด ทำให้โมเลกุลของลิกนินเกิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบฟีนอลิก เช่น วานิลลิน (vanillin) ซิงรินกัลดีไฮด์ (syringaldehyde) และเบนซัลดีไฮด์ (benzaldehyde) เป็นต้น มีรายงานว่าสารยับยั้งการเจริญประเภทสารประกอบฟีนอลิกนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ (Ximenes และคณะ, 2010) และกลุ่มที่ 3 เป็นกรดอะลิฟาติก (aliphatic acids) เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) และกรดลิวูลินิก (levulinic acid) เป็นต้น กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยหมู่แอซิติล (acetyl group) ของเฮมิเซลลูโลส กรดลิวูลินิกได้จากการสลายตัวของ 5HMF และกรดฟอร์มิกได้จากการสลายตัวของเฟอร์ฟูรัลและ 5HMF



ภาพที่ 2.14 ผลผลิตพลอยได้ จากการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส (ดัดแปลงจาก Patel และคณะ (2016))

อิทธิพลของสารยับยั้งการเจริญต่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ยีสต์บางสายพันธุ์ทนต่อความเป็นพิษของสารยับยั้งการเจริญบางชนิด (Yu และคณะ, 2014) ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถเมแทบอลิซึมสารยับยั้งการเจริญ (Yu และคณะ, 2011; Xavier และคณะ, 2017) Poontawee และคณะ (2017) ศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งการเจริญ 5 ชนิด คือ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เฟอร์ฟูรัล 5HMF และวานิลลิน ต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Rhodospiridium fluviale* DMKU-SP314 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสผสมกับน้ำตาลไซโลส อัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอนผสม พบว่ากรดฟอร์มิกและเฟอร์ฟูรัลมีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันมากที่สุด ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดฟอร์มิกและเฟอร์ฟูรัลที่ทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ลดลงมากกว่า 50% คือ 0.25 และ 0.05 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟอร์มิกเป็น 0.5 กรัม/ลิตร พบว่าทำให้ยีสต์ไม่เจริญและไม่ผลิตน้ำมัน ในขณะที่กรดอะซิติก 5HMF และวานิลลิน ทำให้การเจริญและการผลิตน้ำมันของ *R. fluviale* DMKU-SP314 ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 5HMF ที่พบว่าที่ความเข้มข้นสูงถึง 7 กรัม/ลิตร ไม่มีผลต่อการผลิตน้ำมันแต่ทำให้การเจริญลดลงเพียง 8.8%

Yu และคณะ (2011) รายงานว่าสารยับยั้งการเจริญ 3 ชนิด คือ กรดอะซิติก เฟอร์ฟูรัล และ 5HMF ปริมาณ 4.0, 0.44 และ 0.05 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในไฮโดรไลเสตฟางข้าว มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Cryptococcus curvatus* ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมันสูงสุดที่ได้เท่ากับ 33.5% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) 17.2 กรัม/ลิตร และ 5.8 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ขณะเดียวกันพบว่า หลังการเพาะเลี้ยง *Cr. curvatus* ในไฮโดรไลเสตฟางข้าวนาน 1 วัน ปริมาณกรดอะซิติกและเฟอร์ฟูรัลทั้งหมดถูกเมแทบอลิซึม และเมื่อศึกษาอิทธิพลของเฟอร์ฟูรัลและ 5HMF ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 และ 3 กรัม/ลิตร ต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Cr. curvatus* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด พบว่าเฟอร์ฟูรัลมีผลต่อการผลิตน้ำมันมากกว่า 5HMF เฟอร์ฟูรัล 1 กรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณเซลล์และปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ลดลง 72% และ 62% ตามลำดับ ในขณะที่ 5HMF เข้มข้นสูงถึง 3 กรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณเซลล์และปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของ *Cr. curvatus* ลดลงเพียง 5.7% และ 7.9% ตามลำดับ

Xavier และคณะ (2017) รายงานว่าสารยับยั้งการเจริญ 3 ชนิด ที่พบในไฮโดรไลเสตชานอ้อย คือ กรดอะซิติก 2.6 กรัม/ลิตร เฟอร์ฟูรัล 0.04 กรัม/ลิตร และ 5HMF 0.02 กรัม/ลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 โดยพบว่าระหว่างการผลิตน้ำมัน ปริมาณของกรดอะซิติก เฟอร์ฟูรัล และ 5HMF ในไฮโดรไลเสตลดลง ผลการศึกษาจีโนมของ *L. starkeyi* DSM 70296 พบยีน *hmfH hmfD hmfE hmfF* และ *hmfG* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมเฟอร์ฟูรัล และ 5HMF และยีน *ACS* (actyl CoA desaturase gene) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมกรดอะซิติก Vorapreeda และคณะ (2012) รายงานว่ายีสต์อุตสาหกรรมน้ำมันสามารถใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตน้ำมัน เพราะกรดอะซิติกเป็นสับสเตรตสำหรับสังเคราะห์ acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดไขมัน Liu และคณะ (2015) พบว่า *T. fermentans* สามารถใช้กรดอะซิติกเข้มข้นตั้งแต่ 1.5 ถึง 30 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตน้ำมัน ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์สูงสุดที่ได้เท่ากับ 34.1% เมื่อเจริญในอาหารที่มีกรดอะซิติก 20 กรัม/ลิตร สอดคล้องกับ Huang และคณะ (2016) ที่รายงานว่า *R. toruloides* สามารถใช้กรดอะซิติก 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตน้ำมันได้ โดยมีปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 48.2% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง)

เพื่อที่จะลดอิทธิพลของสารยับยั้งการเจริญในไฮโดรไลเสตลิกโนเซลลูโลส หลายงานวิจัยจึงศึกษาวิธีการลดความเป็นพิษ (detoxification) ก่อนการนำมาใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ วิธีการลดความเป็นพิษทำได้หลายวิธี เช่น การใช้เอนไซม์ laccase และ peroxidase บริสุทธิ์จากเชื้อรา *Trametes versicolor* ลดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไฮโดรไลเสตไม้วิลโลว์ (willow wood) (Jönsson และคณะ, 1998) การใช้จุลินทรีย์เมแทบอลิซสารพิษโดยตรง เช่น ใช้ *Coniocheata ligniaria* NRRL30616 ย่อยสลายเฟอร์ฟูรัลและ 5HMF ในไฮโดรไลเสตต้นข้าวโพด (Nichols และคณะ, 2008) การระเหยเป็นไอ (evaporation) (Larsson และคณะ, 1999) การแลกเปลี่ยนประจุเรซิน (ion-exchange resin) การดูดซับ (adsorption) ด้วยถ่านกัมมันต์ และวิธีปรับต่างเกิน (overliming) ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Ca(OH)_2) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) (Guo และคณะ, 2013) เป็นต้น

วิธีปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นวิธีการกำจัดสารยับยั้งการเจริญในไฮโดรไลเสตลิกโนเซลลูโลสซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดที่มีประสิทธิภาพสูง นิยมใช้มากที่สุด (Larsson และคณะ, 1999; Qin และคณะ, 2017) และราคาถูก (Ranatunga และคณะ, 2000) กลไกการกำจัดสารยับยั้งการเจริญไม่ถูกระบุแน่ชัด Van Zyl และคณะ (1988) รายงานว่าการปรับต่างเกินกำจัดสารพิษโดยการตกตะกอน ในขณะที่ Persson และคณะ (2002) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของตะกอนที่เกิดขึ้นจากวิธีปรับต่างเกิน รายงานว่าปริมาณของสารยับยั้งการเจริญที่ลดลงน่าจะเป็นเพราะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีมากกว่าการตกตะกอน

Huang และคณะ (2009) กำจัดสารยับยั้งการเจริญในไฮโดรไลเสตฟางข้าวที่ได้จากการย่อยฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) ภายใต้ความร้อนและความดันในหม้อหนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ด้วยวิธีการ 3 ขั้นตอน โดยขั้นแรกนำไฮโดรไลเสตฟางข้าวมาปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ขั้นต่อมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยชนิดสุญญากาศ (vacuum evaporator) และขั้นสุดท้ายดูดซับด้วยเรซิน พบว่าการปรับต่างเกินทำให้ปริมาณเฟอร์ฟูรัลและ 5HMF ลดลง 56% และ 12.5% ตามลำดับ เฟอร์ฟูรัลที่เหลือทั้งหมดถูกกำจัดออกหมดหลังการทำการระเหยสุญญากาศ แต่ 5HMF กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้น 3.86 เท่า และเมื่อดูดซับด้วยเรซินพบว่าปริมาณ 5HMF ลดลงคิดเป็น 25% ของปริมาณตั้งต้น การลดลงของสารยับยั้งการเจริญมีผลทำให้การเจริญและการผลิตน้ำมันของ *T. fermentans* CICC 1368 เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมันสูงสุดที่ได้เท่ากับ 40.1% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) 28.6 กรัม/ลิตร และ 11.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

Huang และคณะ (2011) รายงานว่าเฟอร์ฟูรัลและ 5HMF ในไฮโดรไลเสตซึ่งข้าวโพดถูกกำจัดออกได้โดยวิธีปรับต่างเกินร่วมกับการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ นอกจากนี้ยังรายงานว่าการกำจัดสารยับยั้งการเจริญด้วยวิธีนี้ทำให้ปริมาณไนโตรเจนในไฮโดรไลเสตซึ่งข้าวโพดลดลง

อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเพิ่มขึ้น และการผลิตน้ำมันของ *T. cutneum* CX1 ในไฮโดรไลเสตซังข้าวโพดที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญด้วยวิธีดังกล่าวนี้เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์เท่ากับ 23.5% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตซังข้าวโพดที่ไม่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญ 2 เท่า

Tsige และคณะ (2012) รายงานการกำจัดสารยับยั้งการเจริญในไฮโดรไลเสตราข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยวิธีการปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าทำให้สารยับยั้งการเจริญ 2 ชนิด คือ เพอร์ฟูรัลและ 5HMF ลดลง 24.0% และ 25.0% ตามลำดับ และพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Y. lipolytica* Po1g ในไฮโดรไลเสตราข้าวที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญภายใต้ภาวะที่เหมาะสม *Y. lipolytica* Po1g มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์และปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 48.02% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 10.75 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

Yu และคณะ (2011) ศึกษาการกำจัดสารยับยั้งการเจริญในไฮโดรไลเสตฟางข้าวสาลีที่ถูกย่อยด้วยกรดโดยวิธีปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าปริมาณเพอร์ฟูรัลและ 5HMF ลดลงจาก 0.44 กรัม/ลิตร เป็น 0.03 กรัม/ลิตร และ จาก 0.05 กรัม/ลิตร เป็น 0.02 กรัม/ลิตร ตามลำดับ การลดลงของสารยับยั้งการเจริญนี้ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Cr. curvatus*, *Y. lipolytica*, *Rh. glutinis* และ *L. starkeyi* โดยปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมันของยีสต์ทุกสายพันธุ์ในไฮโดรไลเสตฟางข้าวที่ไม่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญสูงกว่าในไฮโดรไลเสตที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญ ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีสต์อดทนน้ำมันทุกสายพันธุ์ที่ศึกษาทนต่อสารยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้นที่พบในไฮโดรไลเสต และการกำจัดสารยับยั้งการเจริญทำให้ปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสต ลดลง การเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์จึงลดลง นอกจากนี้วิธีปรับต่างเกินยังถูกใช้เพื่อกำจัดแร่ธาตุบางชนิดในไฮโดรไลเสต Jönsson และคณะ (2013) รายงานว่าการปรับต่างเกินสามารถตกตะกอนเกลือที่ละลายน้ำได้ (soluble salt) ที่มากเกินไปออกจากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังได้ ซึ่งมีผลทำให้การเจริญและกระบวนการหมักของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น

พุดิตา โชคเหรียญสุขชัย (2561) รายงานว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่พบในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า *Pseudozyma tsukubaensis* YWT 7-2 ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตที่ผ่านการปรับต่างเกินมีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 34.27% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) 4.36 กรัม/ลิตร และ 1.49 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตที่ไม่ผ่านการปรับต่างเกิน

2.6 ใบอ้อย

อ้อย (*Saccharum spp.*) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย โดยประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกผลผลิตอ้อย และน้ำตาลทรายเป็นอันดับ 1 ของอาเซียน และอันดับ 2 ของโลกรองจากประเทศบราซิล มีพื้นที่ปลูกอ้อยรวมทั้งสิ้นประมาณ 12.24 ล้านไร่ (19,578 ล้านตารางเมตร) ครอบคลุมพื้นที่ 47 จังหวัด ใน 4 ภูมิภาคของประเทศ ได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออก (กลุ่มวิชาการและสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย, 2562) ปีการผลิต 2561/2562 ที่ผ่านมามีรายงานการเก็บเกี่ยวอ้อยเข้าโรงงานน้ำตาลสูงถึง 130 ล้านตัน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในอนาคต เนื่องจากรัฐบาลมีนโยบายผลักดันให้เปลี่ยนพื้นที่ปลูกข้าวที่อยู่ในพื้นที่ไม่เหมาะสมเป็นพื้นที่ปลูกอ้อย เพราะอ้อยนอกจากจะสามารถนำไปใช้ผลิตเป็นน้ำตาลทรายแล้ว กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตพลังงานทดแทน พลาสติกชีวภาพ เคมีชีวภาพ และเวชภัณฑ์ชีวภาพ นอกจากนี้ชีวมวลเหลือทิ้ง เช่น ชานอ้อย ยังสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อการผลิตกระแสไฟฟ้า ใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตเยื่อกระดาษ และบรรจุภัณฑ์ (กลุ่มส่งเสริมอุตสาหกรรมชีวภาพ, 2562)

อย่างไรก็ตามพบว่ายังไม่มีการศึกษาการนำใบอ้อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งหลังการเก็บเกี่ยวไปใช้ประโยชน์ แต่ผลผลิตอ้อยจะมีใบอ้อยประมาณ 17 ล้านตัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2556) เกษตรกรนิยมเผาใบอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยว เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการเก็บเกี่ยว ไม่เสียเวลาตัดและลอกกาบใบอ้อยที่แหลมคม อ้อยไฟไหม้ซึ่งได้จากการเผาอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยวจะได้ควันเข้าโรงงานน้ำตาลทรายก่อนอ้อยที่ตัดสด การเผาใบอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยวก่อให้เกิดฝุ่นและก๊าซซึ่งเป็นมลพิษทางอากาศ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น ฝุ่นละอองขนาดเล็ก (PM2.5) PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon) คาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ อัลดีไฮด์ และ ซัลเฟอร์ เป็นต้น (Silveira และคณะ, 2013) ทำให้ปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดินลดลง (Souza และคณะ, 2012) ด้วยเหตุนี้การสร้างมูลค่าให้แก่ใบอ้อยจึงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่ง ในการสร้างแรงจูงใจให้แก่เกษตรกรลดหรือหยุดการเผาใบอ้อย เพราะใบอ้อยนั้นเป็นหนึ่งในชีวมวลลิกโนเซลลูโลสที่มีศักยภาพ เนื่องจากโครงสร้างประกอบด้วยเซลลูโลส 38.5% เฮมิเซลลูโลส 23% และลิกนิน 15.6% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (Jutakanoke และคณะ, 2012) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพและย่อยจะได้น้ำตาลที่จุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น

Jutakanoke และคณะ (2012) รายงานการใช้ไฮโดรไลสเตใบอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางและย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 9.8 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 4.71 กรัม/ลิตร Moodley และ Kana (2019) ศึกษาการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* BY4743

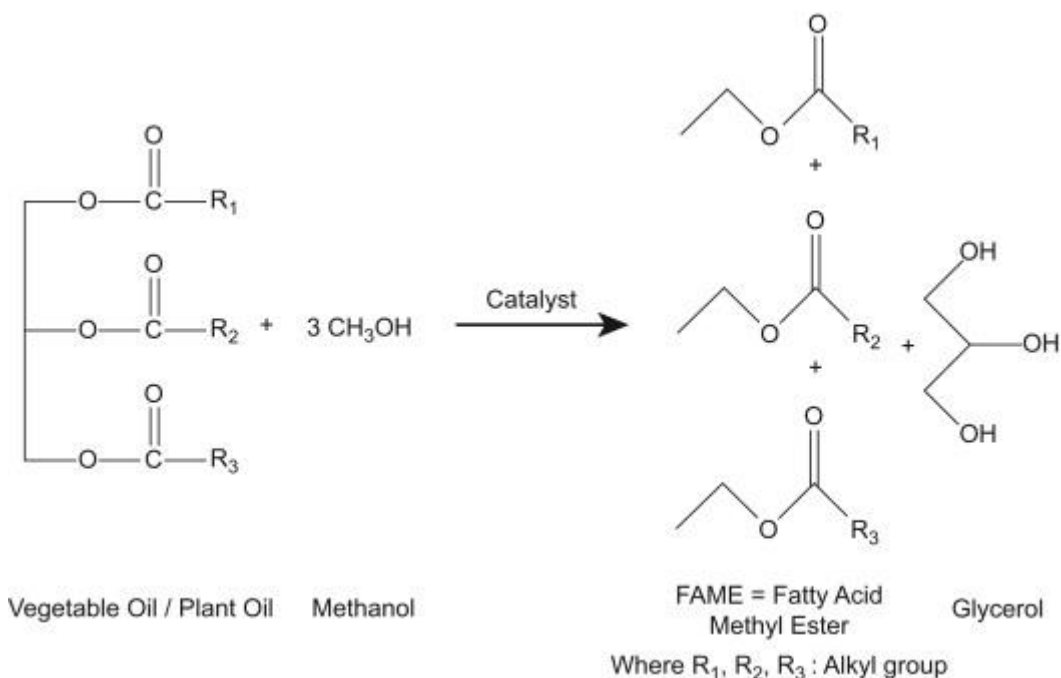
จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลหน่วยย่อยในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเลี้ยงยีสต์ในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์และต่าง ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 31.06 กรัม/ลิตร

Poontawee และคณะ (2018) ผลิตน้ำมันยีสต์ *Rhodosporidiobolus fluvialis* DMKU-SP314 โดยการเพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตยอคไบอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพโดยสารละลายผสมของโซเดียมไฮดรอกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ผสมกับกลีเซอรอลอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน เท่ากับ 60 โดยกระบวนการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ขนาด 2 ลิตร พบว่า *Rho. fluvialis* DMKU-SP314 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์และผลผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 75.0% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 18.2 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

Pranimit และคณะ (2019) ผลิตน้ำมันโดย *Candida* sp. NG17 จากไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางแล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบ 18.7 และ 19.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ได้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด 2.3 กรัม/ลิตร และรายงานว่าการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม/ลิตร และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของไฮโดรไลเสตไบอ้อยเป็น 6.5 ทำให้ผลผลิตน้ำมันที่ได้เพิ่มขึ้นเป็น 5.07 กรัม/ลิตร

2.7 สมบัติของไบโอดีเซลจากไขมันและน้ำมัน

ไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์กรดไขมัน (fatty acid methyl ester, FAME) เป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลที่สะอาด การเผาไหม้สมบูรณ์ ปริมาณฝุ่นและควันดำที่ปล่อยออกมาต่ำ ไม่ปล่อยกำมะถัน จึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าดีเซลจากฟอสซิล ไบโอดีเซลผลิตได้จากกระบวนการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของน้ำมัน ทั้งน้ำมันจากพืช เช่น เรพซิด ปาล์ม ถั่วเหลือง และสบู่ดำ เป็นต้น ไขมันสัตว์ น้ำมันใช้แล้วจากครัวเรือน และน้ำมันจุลินทรีย์ เช่น จุลสาหร่าย และยีสต์ (Papanikolaou และ Aggelis, 2011; Sitepu และคณะ, 2014) โดยการนำมาทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) กับเมทานอลหรือเอทานอล (ภาพที่ 2.15) สมบัติทางกายภาพและเคมีของไบโอดีเซลที่ได้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมัน (Hoekman และคณะ, 2012) สมบัติที่สำคัญของไบโอดีเซลมีดังนี้



ภาพที่ 2.15 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (Patel และ Shah, 2015)

1) ความหนืด (viscosity) คือ สมบัติการต้านการไหลเป็นสมบัติทางกายภาพสำคัญที่บอกลักษณะคุณภาพของไบโอดีเซล (Hoekman และคณะ, 2012) เนื่องจากความหนืดมีผลต่ออัตราการไหลเข้าสู่เครื่องยนต์และการจ่ายน้ำมันของหัวฉีด หากไบโอดีเซลมีความหนืดสูง หัวฉีดจะพ่นฝอยละอองน้ำมันยาก ละอองน้ำมันที่ได้มีขนาดใหญ่ จึงระเหยเป็นไอได้ยาก ประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องยนต์ที่ได้ต่ำ เพราะการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ ปลดปล่อยมลพิษสูง ความหนืดของไบโอดีเซลมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของเมทิลเอสเทอร์กรดไขมัน (Hoekman และคณะ, 2012) โดยค่าความหนืดจะสูงขึ้นเมื่อจำนวนคาร์บอนอะตอมของเมทิลเอสเทอร์กรดไขมันและปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวสูงขึ้น (Knothe และคณะ, 2003; Refaat, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำมันที่มีกรดไขมันซึ่งมีการจัดเรียงตัวในทิศตรงกันข้าม (trans-isomer) สูง เช่น น้ำมันมะพร้าว จะมีค่าความหนืดสูงกว่าน้ำมันที่มีกรดไขมันซึ่งมีการจัดเรียงตัวในทิศเดียวกัน (cis-isomer) (Refaat, 2009) ความหนืดเป็นหนึ่งในสมบัติของไบโอดีเซลที่ต้องรายงานตามข้อกำหนดมาตรฐานคุณภาพไบโอดีเซล โดยมาตรฐานไบโอดีเซลของประเทศสหรัฐอเมริกา (ASTM D6751) และสหภาพยุโรป (EN 14214) กำหนดค่าความหนืดมาตรฐาน เท่ากับ 1.9-6.0 และ 3.5-5.0 ตามลำดับ

2) ความหนาแน่น (density) คือ ปริมาณของมวลสารต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของไบโอดีเซล มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องยนต์ เพราะอัตราการฉีดจ่ายไบโอดีเซลเข้าสู่เครื่องยนต์ขึ้นอยู่กับความหนาแน่น ความหนาแน่นของไบโอดีเซลสัมพันธ์กับระดับความอืดตัวของกรดไขมัน โดยพบว่าความหนาแน่นของไบโอดีเซลจะสูงขึ้นเมื่อมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Refaat, 2009) และสัมพันธ์กับความถ่วงจำเพาะ (specific gravity)

3) การไหลที่อุณหภูมิต่ำ (cold flow property) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องพิจารณา เพราะหากไบโอดีเซลขาดสมบัติการไหลที่อุณหภูมิต่ำจะมีผลต่อการทำงานของเครื่องยนต์ โดยอาจเกิดการอุดตันที่หัวกรองน้ำมันอันเนื่องมาจากการเกิดไข ทำให้น้ำมันไหลเข้าสู่เครื่องยนต์ได้ไม่เพียงพอ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการประเมินสมรรถนะการไหลที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้มาตรฐานไบโอดีเซลในหลายประเทศไม่มีการระบุสมบัติการไหล แต่ไบโอดีเซลที่จำหน่ายทางการค้าจะระบุจุดหมอก (cloud point) แทน (Hoekman และคณะ, 2012) จุดหมอก คือ อุณหภูมิที่ต่ำที่สุดที่ไบโอดีเซลจะเริ่มเป็นผลึกหรือไขชัดเจน การไหลจุดหมอกนี้สัมพันธ์กับปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว โดยพบว่าไบโอดีเซลที่ผลิตจากวัตถุดิบน้ำมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูง เช่น น้ำมันปาล์ม จะมีจุดหมอกสูงหรือมีสมบัติการไหลที่อุณหภูมิต่ำที่ไม่ดี (Serdari และคณะ, 1999) ปัจจุบันแก้ปัญหาโดยผสม ไบโอดีเซลที่มีจุดหมอกสูงกับไบโอดีเซลที่มีจุดหมอกต่ำกว่า (Sarin และคณะ, 2010)

4) เลขซีเทน (cetane number) คือ ตัวเลขที่แสดงถึงเวลาหน่วงการจุดระเบิดของเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ ใช้บอกคุณภาพของไบโอดีเซลได้ ถ้าเลขซีเทนสูงแสดงว่ามีเวลาหน่วงการจุดระเบิดสั้น โดยทั่วไปไบโอดีเซลจะมีเลขซีเทนสูงกว่าดีเซล เลขซีเทนของไบโอดีเซลจะแปรผันตรงกับค่าเฉลี่ยระดับความอืดตัวของกรดไขมัน โดยไบโอดีเซลที่ผลิตจากวัตถุดิบน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง จะมีเลข ซีเทนสูง (Knothe และคณะ, 2003; Knothe, 2005) มาตรฐานไบโอดีเซลของประเทศสหรัฐอเมริกา (ASTM D6751) และสหภาพยุโรป (EN 14214) กำหนดให้ไบโอดีเซลต้องมีเลขซีเทนไม่ต่ำกว่า 51

5) ค่าไอโอดีน (iodine value) คือ ปริมาณกรัมของไอโอดีนที่ทำปฏิกิริยาแฮโลจีเนชัน (halogenation) กับพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมัน 100 กรัม ค่าไอโอดีนเป็นตัวบ่งชี้ถึงความไม่อิ่มตัวของกรดไขมัน (Sajjadi และคณะ, 2016) หากมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบมาก ค่าไอโอดีนจะสูง ความคงตัวต่อออกซิเดชันจะต่ำ หรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันง่าย เกิดการหืนง่าย แต่หากไบโอดีเซลมีค่าไอโอดีนต่ำเกินไปก็จะทำให้มีจุดหมอกสูง (Hoekman และคณะ, 2012) มาตรฐานไบโอดีเซลของประเทศไทยและสหภาพยุโรป (EN 14214) กำหนดให้ค่าไอโอดีนของไบโอดีเซลต้องไม่เกินกว่า 120

6) ค่าความร้อน (heating value) คือ ความร้อนที่จะได้รับจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิง ค่าความร้อนของเชื้อเพลิงยิ่งสูงแสดงถึงคุณภาพของเชื้อเพลิงยิ่งดี โดยทั่วไปไบโอดีเซลจะมีค่าความร้อนต่ำกว่าดีเซล เนื่องจากไบโอดีเซลมีปริมาณออกซิเจนสูงจึงมีพลังงานมวลต่ำ (Hoekman และคณะ, 2012) ค่าความร้อนอาจรายงานได้ 2 ค่า คือ ค่าความร้อนสูง (high heating value) และ ค่าความร้อนต่ำ (low heating value) ค่าความร้อนจะสูงขึ้นเมื่อจำนวนคาร์บอนของกรดไขมันเพิ่มขึ้น ในขณะที่เดียวกัน ค่าความร้อนจะลดลงเมื่อปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น (Demirbas, 1998)

7) ความคงตัวต่อออกซิเดชัน (oxidative stability) คือ ความคงตัวของเชื้อเพลิงต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยความคงตัวต่อออกซิเดชันนี้จะขึ้นอยู่กับความไม่อิ่มตัวของกรดไขมัน หากกรดไขมันมีความไม่อิ่มตัวสูง ไบโอดีเซลจะมีความคงตัวต่อออกซิเดชันต่ำ โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนจะไม่คงตัวต่อออกซิเจนและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันง่ายกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวและกรดไขมันอิ่มตัวตามลำดับ (Knothe, 2005)

Hoekman และคณะ (2012) สรุปว่าน้ำมันที่เหมาะสมจะใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลควรมีคุณสมบัติเบื้องต้นดังนี้ คือ มีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวต่ำ เพื่อให้มีสมบัติการไหลที่อุณหภูมิต่ำที่สมควร มีปริมาณกรดไขมันโอเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูง เพื่อช่วยรักษาความสมดุลระหว่างค่าความคงตัวออกซิเดชัน และสมบัติการไหลที่อุณหภูมิต่ำ โดยไม่กระทบต่อค่าซีเทน และไม่ควรมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนมาก เพื่อลดความหนืด ความหนาแน่น และเพิ่มความคงตัวต่อออกซิเดชัน

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 ยีสต์

ยีสต์อุตมน้ำมัน *Lipomyces starkeyi* JCM 5995 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Japan Collection of Microorganism ประเทศญี่ปุ่น

ยีสต์อุตมน้ำมัน *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2 (MSCU 1058) (รัชนา พระนิมิตร, 2560) ศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ใบอ้อย

ใบของอ้อยพันธุ์ *Saccharum officinarum* L.CSB06-2-15 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคที่ 3 อำเภอบางพระ จังหวัดชลบุรี

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) รุ่น CH30, Olympus Co. Ltd., Japan

3.3.2 กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) รุ่น BX51, Olympus Co. Ltd., USA

3.3.3 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate magnetic stirrer) รุ่น 502P-2, PMC Industries Inc., USA

3.3.4 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีตัววัดสัญญาณชนิดเฟมไอออไนเซชัน (GC-FID, gas chromatography-flame ionization detector) รุ่น 7890B, Agilent Technologies Inc., USA

3.3.5 เครื่องควบคุมอุณหภูมิชนิดแห้ง (dry block bath) รุ่น TDB-120, Biosan Co. Ltd., Latvia

3.3.6 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) รุ่น Varian/Prostar 210, Varian Inc., USA

3.3.7 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2-digital balance) รุ่น PG6002-S, Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland

- 3.3.8 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4-digital balance) รุ่น AG285, Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
- 3.3.9 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (autopipette) รุ่น Pipet-lite™ XLS SL-5000, Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
- 3.3.10 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (autopipette) รุ่น P10, P20, P200, P1000 และ P5000, Gilson Co. Inc., France
- 3.3.11 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (autopipette) รุ่น Research plus ® single channel 1-10 ml, Eppendorf Co. Ltd., Thailand
- 3.3.12 เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentation system) รุ่น Universal Hood II, Bio-Rad Laboratories Inc., USA
- 3.3.13 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) รุ่น Eyla FD-1, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan
- 3.3.14 เครื่องบ่มแบบเขย่า (incubator shaker) รุ่น Innova 2300, New Brunswick Scientific Co. Ltd., UK
- 3.3.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R, Beckman Coulter Life Science Co. Ltd., USA
- 3.3.16 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิได้สำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก (high speed refrigerated microtube centrifuge) รุ่น Kubota 1920, Kubota Co. Ltd., Japan
- 3.3.17 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วรอบต่ำ (spin down microcentrifuge) รุ่น HF-120, Tomy Kogyo Co. Ltd., Japan
- 3.3.18 เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G560E, Scientific Industries Inc., USA
- 3.3.19 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermocycler) รุ่น T100 thermal cycler, Bio-Rad Laboratories Inc., USA
- 3.3.20 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) รุ่น Mupid-ex, Takara Co. Ltd., Japan
- 3.3.21 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys™ 10S-UV-VIS, Thermo Scientific Inc., USA
- 3.3.22 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงชนิดนาโน (nanodrop spectrophotometer) รุ่น nano drop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc., USA

- 3.3.23 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น S20 SevenEasy™, Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
- 3.3.24 เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพแบบหลายพารามิเตอร์ (multiparameter bioanalytical system) รุ่น 7100 MBS, YSI Inc., USA
- 3.3.25 ไชริงค์ฟิลเตอร์ (syringe filter) ขนาดรูพรุน (pore size) 0.22 ไมโครเมตร (Sartorius Co. Ltd., Germany)
- 3.3.26 ตะแกรงร่อนเบอร์ 20 ขนาดตาข่าย 850 ไมครอน Advantech Co. Ltd., USA
- 3.3.27 ตะแกรงร่อนเบอร์ 40 ขนาดตาข่าย 425 ไมครอน Advantech Co. Ltd., USA
- 3.3.28 ตู้แช่แข็ง (freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U536D, Sanyo Electronic Co., Japan
- 3.3.29 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (ultra-low temperature freezer) ชนิด -86 องศาเซลเซียส รุ่น Thermo Scientific Forma® 8620, Thermo Electron Co., USA
- 3.3.30 ตู้ดูดไอระเหยสารเคมี (fume hood) รุ่น Flexlab ductless, Official Equipment Manufacturing Co. Ltd., Thailand
- 3.3.31 ตู้บ่ม (incubator) รุ่น BE 600, Memmert GmbH Co., Germany
- 3.3.32 ตู้บ่มแบบเขย่า (incubator shaker) รุ่น Innova 4330, New Brunswick Scientific Co. Ltd., UK
- 3.3.33 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น H2, LAB service Ltd., Thailand
- 3.3.34 ตู้อบแห้ง (hot air oven) Contherm Scientific Ltd., New Zealand
- 3.3.35 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-315, Tomy Kogyo Co. Ltd., Japan
- 3.3.36 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-215, Tomy Kogyo Co. Ltd., Japan
- 3.3.37 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker) รุ่น Gyromax 939 XL, Amerex Instruments Inc., USA
- 3.3.38 อ่างสั่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic bath) รุ่น E30H, Elma Schmidbauer GmbH Co., Germany

3.4 สารเคมี

- 3.4.1 กรดซัลฟูริก (sulfuric acid: H_2SO_4) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.2 กรดอะซิติก (acetic acid: $C_2H_4O_2$) Sigma Inc., Germany
- 3.4.3 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: HCl) Sigma Inc., Germany
- 3.4.4 แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride: $CaCl_2$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.5 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide: $Ca(OH)_2$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.6 แคลเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.7 คลอโรฟอร์ม (chloroform 99.8% v/v) V.S. Chem House, Thailand
- 3.4.8 คลอแรมฟีนีคอล (chloramphenicol) AppliChem, Germany
- 3.4.9 คอร์นมีล (corn meal) Becton, Dickinson and Co., France
- 3.4.10 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.11 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) Gruppo Montedison Co., Italy
- 3.4.12 ชุดทดสอบ API-ID32 (BioMerieux, France)
- 3.4.13 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.14 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate: SDS: $C_{12}H_{25}OSO_2ONa$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.15 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$) May & Baker Ltd., England
- 3.4.16 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.17 ดี-กลูโคส (D-Glucose: $C_6H_{12}O_6$) Sigma Inc., Germany
- 3.4.18 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.19 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO) Fisher Scientific, UK
- 3.4.20 ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน (tris (hydroxymethyl) aminomethane) Affymetrix Inc., USA
- 3.4.21 ทริส-อะซีเตท-อีดีทีเอ (tris-acetate-EDTA: TAE buffer) Vivantis Inc., USA
- 3.4.22 ไนล์เรด (nile red: $C_{20}H_{18}N_2O_2$) Chem Impex Int'l Inc., USA
- 3.4.23 เบคโตเพปโตน (Bactopeptone) Becton Dickinson and Co., France
- 3.4.24 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate: KH_2PO_4) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.25 โพแทสเซียมอะซีเตท (potassium acetate: CH_3COOK) Sigma Inc., Germany

- 3.4.26 โพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) J.T. Baker Inc., USA
- 3.4.27 เฟอรัฟรัล (furfural) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.28 เมทานอล (methanol 99.9% v/v) V.S. Chem House, Thailand
- 3.4.29 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.30 แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.31 วุ้นผง (agar) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.32 ยีสต์ไนโตรเจนเบส (yeast nitrogen base) Becton Dickinson and Co., France
- 3.4.33 สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ (yeast extract) Becton Dickinson and Co., France
- 3.4.34 สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) Becton Dickinson and Co., France
- 3.4.35 อะกาโรส (agarose) Sigma Inc., Germany
- 3.4.36 อะซิโตน (acetone) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.37 เอทานอล (ethanol 99% v/v) Sigma Inc., Germany
- 3.4.38 เอทิลีนไดอามีนเตตราอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) Sigma
Inc., Germany
- 3.4.39 เอนไซม์เซลลูเลส ยี่ห้อ Accellerase®1500 (Danisco Inc., USA)
- 3.4.40 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate: $(NH_4)_2SO_4$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.41 ไอโซโพรพานอล (isopropanol 99.5% v/v) Sigma Inc., Germany
- 3.4.42 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol 98% v/v) Sigma Inc., Germany
- 3.4.43 ไอรอน (III) คลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.44 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟรัลดีไฮด์ (5-hydroxymethylfurfural) Sigma Inc., Germany
- 3.4.45 ไฮโดรเจนโบเรต (Hydrogen borate) Merck Co. Ltd., Germany

3.5 วิธีการ

3.5.1 คัดแยกยีสต์

เก็บตัวอย่างดิน น้ำ และวัสดุชีวภาพอื่น ๆ จากแหล่งธรรมชาติ 9 แห่ง ได้แก่ สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด พื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จังหวัดระนอง และวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พิกัดแหล่งเก็บตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 3.1 ชนิดของตัวอย่างที่เก็บได้จากแหล่งเก็บตัวอย่างแต่ละแหล่งแสดงดังตารางที่ 3.2-3.10

นำตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม หรือปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว สูตรจำกัดปริมาณไนโตรเจน (nitrogen depleted medium; NDM) (ดัดแปลงจาก Thanh (2006)) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดแก้วขนาด 25 x 250 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ NDM ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2% คลอโรฟอร์มินคอลล 0.01% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.085% ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0.015% แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.05% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.01% แคลเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และสารละลายแร่ธาตุผสมเข้มข้น (mixed mineral stock solution) 0.184% (ปริมาตร/ปริมาตร) สารละลายแร่ธาตุผสมเข้มข้น ประกอบด้วยไฮโดรเจนโบเรต (H_3BO_3) 0.1% คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.1% โพแทสเซียมไอโอดाइด์ (KI) 0.1% เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) 0.1% แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.1% โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MOO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.1% และซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำเชื้อที่ได้ให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยวิธีขีดลากเชื้อ (streak plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้บนอาหารแข็งวันเดียว YM ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 1% เพปโทน 0.5% สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.3% และสารสกัดจากมอลต์ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.1 ที่ตั้งและพิกัดของแหล่งเก็บตัวอย่าง

แหล่งเก็บตัวอย่าง	ตำแหน่งที่ตั้ง	ละติจูด, ลองจิจูด
สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2	ตำบลบ่อ อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี	12.381264, 102.357817
สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4	ตำบลหนองโสน อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด	12.169602, 102.406304
สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7	ตำบลคลองโคน อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม	13.184048, 100.020182
สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6	ตำบลบางขุนไทร อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี	12.412191, 99.984147
สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11	ตำบลทรายแดง อำเภอเมืองระนอง จังหวัดระนอง	10.173566, 98.710563
สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45	ตำบลวังกระแจะ อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด	12.208180, 102.552114
พื้นที่สงวนชีวมณฑล	ตำบลหงาว อำเภอเมืองระนอง จังหวัดระนอง	9.878145, 98.602366
อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว	ตำบลหงาว อำเภอเมืองระนอง จังหวัดระนอง	9.856308, 98.627858
วนอุทยานปราณบุรี (PNFP)	ตำบลปากน้ำปราณ อำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	13.327734, 99.988013

ตารางที่ 3.2 ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
1	น้ำบริเวณตอนปลายปากแม่น้ำเวฬุ	WW1		X	
2	น้ำบริเวณต้นโกงกางใบใหญ่	WW2		X	
3	น้ำบริเวณตอนกลางปากแม่น้ำเวฬุ	WW3		X	
4	น้ำบริเวณต้นฝาดดอกขาว	WW4		X	
5	น้ำใต้ต้นเสม็ดดำ	WW5		X	
6	น้ำใต้ต้นโพธิ์ทะเล	WW6		X	
7	น้ำบริเวณรากไม้	WW7		X	
8	น้ำในแม่น้ำเวฬุ	WW8		X	
9	ดินใต้ต้นโพธิ์ทะเล 1	WS1	X		
10	ดินใต้ต้นเสม็ดดำ	WS2	X		
11	ดินใต้รากไม้	WS3	X		
12	ดินตะกอนริมแม่น้ำ	WS4	X		
13	ดินใต้ต้นโพธิ์ทะเล 2	WS5	X		
14	ดินใต้ต้นโกงกางใบใหญ่	WS6	X		
15	ดินใต้ต้นฝาดดอกขาว	WS7	X		
16	รากเฟิร์นบริเวณต้นตะบูน 1	WT1			X
17	มอส	WT2			X
18	รังปลวก	WT3			X
19	ปลวก	WT4			X
20	รากเฟิร์นบริเวณต้นตะบูน 2	WT5			X
21	มอส	WT6			X
22	มอส	WT7			X

ตารางที่ 3.3 ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
1	ดินใต้ต้นโกงกางใบใหญ่จุดที่ 1	BS1	X		
2	ดินทรายดำบริเวณใกล้ชายหาด จุดที่ 1	BS2	X		
3	ดินทรายดำบริเวณใกล้ชายหาด จุดที่ 2	BS3	X		
4	ไม้ผุ	BS4			X
5	ดินทรายดำบริเวณใกล้ชายหาด จุดที่ 3	BS5	X		
6	ดินใต้ต้นโกงกาง	BS6	X		
7	ดินทรายดำบริเวณใกล้ชายหาด จุดที่ 4	BS7	X		
8	ดินใต้ต้นโกงกางใบใหญ่จุดที่ 2	BS8	X		
9	ดินใต้ต้นปรงขาว	BS9	X		
10	ดินใต้ต้นโกงกางใบเล็ก	BS10	X		
11	ดินทรายดำบริเวณใกล้ชายหาด จุดที่ 5	BS11	X		
12	ไลเคนต้นโกงกาง	BT1			X
13	จอมปลวก	BT2			X
14	ซากเห็ดและขอนไม้ผุ	BT3			X
15	ขอนไม้โกงกางใบใหญ่ผุ	BT4			X
16	มอสที่ขึ้นบนขอนไม้โกงกางใบใหญ่ผุ	BT5			X
17	น้ำบริเวณทางเข้าป่าชายเลน	BW1		X	
18	น้ำบริเวณต้นโกงกางใบเล็ก	BW2		X	
19	น้ำบริเวณต้นโกงกางใบใหญ่ จุดที่ 1	BW3		X	
20	น้ำทะเลบริเวณหน้าหาดทรายดำ	BW4		X	
21	น้ำในขอนไม้โกงกางใบใหญ่ผุ	BW5		X	
22	น้ำบริเวณต้นโกงกางใบใหญ่ จุดที่ 2	BW6		X	
23	น้ำบริเวณใกล้ต้นโกงกางหน้าหาด	BW7		X	

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
24	น้ำบริเวณต้นปรงขาว	BW8		X	
25	น้ำบริเวณใกล้ขอนไม้ผุ	BW9		X	
26	น้ำบริเวณต้นโกงกางใบใหญ่ จุดที่ 3	BW10		X	

ตารางที่ 3.4 ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
1	ดินใต้ต้นแสมทะเล จุดที่ 1	SB1	X		
2	ดินใต้ต้นแสมทะเล จุดที่ 2	SB2	X		
3	ดินใต้ต้นโกงกางใบใหญ่และแสมทะเล บริเวณสะพาน	SB3	X		
4	ดินใต้ต้นโกงกางใบใหญ่ บริเวณสะพาน	SB4	X		
5	ดินใต้ต้นแสมทะเล	SB5	X		
6	ดินใต้ต้นโกงกางใบเล็ก จุดที่ 1	SB6	X		
7	ดินใต้ต้นโกงกางใบเล็ก จุดที่ 2	SB7	X		
8	ดินใต้ต้นโกงกางใบใหญ่ จุดที่ 1	SB8	X		
9	ดินใต้ต้นโกงกางใบใหญ่ จุดที่ 2	SB9	X		
10	ดินใต้ต้นโกงกางใบใหญ่ จุดที่ 3	SB10	X		
11	ดินใต้ต้นถั่วขาว	SB11	X		
12	ดินใต้ต้นแสมทะเลบริเวณลานกว้าง จุดที่ 1	SB12	X		
13	ดินใต้ต้นแสมทะเลบริเวณลานกว้าง จุดที่ 2	SB13	X		

ตารางที่ 3.4 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
14	ดินใต้ต้นแสมทะเลบริเวณลานกว้าง จุดที่ 3	SB14	X		
15	น้ำใต้โคนต้นแสมทะเล	WB1		X	
16	น้ำใต้โคนต้นโกงกางใบเล็ก	WB2		X	
17	น้ำดินเลน บริเวณสะพาน	WB3		X	
18	น้ำใต้โคนต้นโกงกางใบใหญ่ บริเวณสะพาน	WB4		X	
19	น้ำใต้โคนต้นโกงกางใบใหญ่ริมทางเดิน	WB5		X	
20	น้ำใต้โคนต้นโกงกางใบใหญ่ บริเวณศาลา จุดพัก	WB6		X	
21	น้ำใต้โคนต้นถั่วขาว	WB7		X	
22	น้ำดินโคลนบริเวณลานกว้าง	WB8		X	

ตารางที่ 3.5 ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
1	ดินริมคลอง	SK1	X		
2	ดินในรูปลาติน จุดที่ 1	SK2	X		
3	ดินใต้กองกิ่งไม้บริเวณโคนต้นแสมทะเล	SK3	X		
4	ลูกจากเน่า	SK4			X
5	เศษไม้ผุ	SK5			X
6	ดินเลนในรูปลาติน จุดที่ 2	SK6	X		
7	ดินใต้กองไม้ผุ	SK7	X		
8	เศษไม้ผุและเศษไม้จากแมลงเจาะไม้	SK8			X
9	ดินเลนในรูปลาติน จุดที่ 3	SK9	X		
10	ต้นมะพร้าวผุ	SK10			X

ตารางที่ 3.5 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
11	ดินเลนในรูปปลาดิน จุดที่ 4	SK11	X		
12	หน้าดินบริเวณที่พบสาหร่ายและเห็ด	SK12	X		
13	ดินเลนในรูปปลาดิน จุดที่ 5	SK13	X		
14	ดินโคลนต้นแสมขาว	SK14	X		
15	ดินใต้ขอนไม้	SK15	X		
16	ดินใต้ต้นมะพร้าวผุ	SK16	X		
17	เพรียงทะเลเกาะหลักไม้ไผ่	SK17			X
18	น้ำบริเวณปากทางเข้าคลอง	WK1		X	
19	น้ำในรูปปลาดินจุดที่ 1	WK2		X	
20	น้ำในรูปปลาดินจุดที่ 2	WK3		X	
21	น้ำในรูปปลาดินจุดที่ 3	WK4		X	
22	น้ำขังในลูกมะพร้าวผุ	WK5		X	
23	น้ำในรูปปลาดินจุดที่ 4	WK6		X	
24	น้ำในรูปปลาดินจุดที่ 5	WK7		X	
25	น้ำในรูปปลาดินจุดที่ 6	WK8		X	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.6 ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
1	ดินรุ่มแอมบอบบริเวณใกล้ต้นปรงทะเลและ เหงือกปลาหมอ	R11-1	X		
2	ดินบริเวณใกล้ต้นเหงือกปลาหมอ	R11-2	X		
3	ดินใต้ต้นหวายล้ง	R11-3	X		
4	ดินใต้ต้นตะบูนดำ	R11-4	X		

ตารางที่ 3.6 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
5	ดินบริเวณใต้ต้นถั่วดำและโกงกางใบเล็ก	R11-5	X		
6	ดินใต้ต้นถั่วขาว	R11-6	X		
7	ดินใต้ต้นตาตุ่มทะเล	R11-7	X		
8	ดินและเศษพีชผุพังบริเวณต้นเฟิน ชายผ้าสีดา	R11-8	X		
9	ดินใต้ต้นเตยทะเล	R11-9	X		
10	ดินบริเวณใต้ต้นมังคุดและโปรงขาว	R11-10	X		
11	ดินใต้ต้นตะบูนดำ	R11-11	X		
12	รากต้นเฟิน	R11-12			X
13	คราบจักจั่น	R11-13			X
14	ดินรุ่มแม่หอบ	R11-14	X		
15	มอสและไลเคน	R11-15			X
16	ไลเคน	R11-16			X
17	ไลเคน	R11-17			X
18	ใบไม้ผุฝัง	R11-18			X
19	น้ำใกล้รุ่มแม่หอบบริเวณใกล้ต้นปรังทะเล และเหงือกปลาหมอ	R11-1W		X	
20	น้ำบริเวณต้นเหงือกปลาหมอ	R11-2W		X	
21	น้ำบริเวณต้นหวายลิง	R11-3W		X	
22	น้ำบริเวณต้นเตยทะเล	R11-9W		X	
23	น้ำบริเวณต้นมังคุด	R11-10W		X	
24	น้ำบริเวณต้นตะบูนดำ	R11-11W		X	

ตารางที่ 3.7 ข้อมูลตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
1	ดินใต้ต้นเสม็ดดำ	MTS1	X		
2	ดินบริเวณต้นรำแพนหิน	MTS2	X		
3	ดินบริเวณลานโล่ง	MTS3	X		
4	ดินบริเวณต้นผักบุงทะเล	MTS4	X		
5	ดินบริเวณต้นปรงทะเล	MTS5	X		
6	ดินใต้ต้นโกงกาง	MTS6	X		
7	ดินใต้ต้นเสม็ด	MTS7	X		
8	เฟิร์น	MTT1			X
9	เห็ด	MTT2			X
10	รังปลวก	MTT3			X
11	มอส จุดที่ 1	MTT4			X
12	มอส จุดที่ 2	MTT5			X
13	น้ำบริเวณต้นเสม็ดดำ	MTW1		X	
14	น้ำบริเวณต้นเสม็ดดำและโกงกางใบเล็ก	MTW2		X	
15	น้ำบริเวณต้นรำแพนหินจุดที่ 1	MTW3		X	
16	น้ำบริเวณต้นรำแพนหินจุดที่ 2	MTW4		X	
17	น้ำบริเวณลานโล่ง จุดที่ 1	MTW5		X	
18	น้ำบริเวณต้นผักบุงทะเล จุดที่ 1	MTW6		X	
19	น้ำบริเวณต้นผักบุงทะเล จุดที่ 2	MTW7		X	
20	น้ำบริเวณลานโล่ง จุดที่ 2	MTW8		X	
21	น้ำบริเวณใกล้กับจุดที่พบเห็ด	MTW9		X	
22	น้ำบริเวณใกล้กับจุดที่พบรังปลวก	MTW10		X	
23	น้ำบริเวณต้นปรงทะเล	MTW11		X	

ตารางที่ 3.7 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
24	น้ำบริเวณลานโล่ง จุดที่ 3	MTW12		X	
25	น้ำบริเวณต้นเสม็ด	MTW13		X	

ตารางที่ 3.8 ข้อมูลตัวอย่างพื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
1	ดินบริเวณหน้ารุ่มแม่หอบใต้ต้นโกงกางใบใหญ่	R1-1	X		
2	ดินใต้ต้นเสม็ดดำ	R1-2	X		
3	ดินใต้ต้นโกงกางใบเล็ก	R1-3	X		
4	ดินใกล้บริเวณรากต้นเสม็ดดำ	R1-4	X		
5	ดินบริเวณรอบต้นพาย	R1-5	X		
6	มอส	R1-6			X
7	ดินบริเวณหน้ารุ่มแม่หอบ	R1-7	X		
8	ดินใต้ต้นตะบูนขาว	R1-8	X		
9	ซากแมลงใบโพรงต้นเสม็ดดำ	R1-9			X
10	รังปลวกบริเวณต้นเสม็ดดำ	R1-10			X
11	ราและซากแมลงจากต้นเสม็ดดำ	R1-11			X
12	ซากใบไม้ทับถม	R1-12			X
13	น้ำบริเวณรุ่มแม่หอบใต้ต้นโกงกางใบใหญ่	R1-1W		X	
14	น้ำบริเวณใต้ต้นเสม็ดดำ	R1-2W		X	
15	น้ำบริเวณใต้ต้นโกงกางใบเล็ก	R1-3W		X	
16	น้ำบริเวณรากต้นเสม็ดดำ	R1-4W		X	
17	น้ำบริเวณรอบต้นพาย	R1-5W		X	

ตารางที่ 3.8 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
18	น้ำบริเวณรูแม่หอบ	R1-7W		X	
19	น้ำบริเวณใต้ต้นตะบูนขาว	R1-8W		X	
20	น้ำบริเวณกองซากใบไม้ทับถม	R1-12W		X	

ตารางที่ 3.9 ข้อมูลตัวอย่างน้ำตกหงาว จังหวัดระยอง

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
1	ดินขอนไม้	N1	X		
2	ดินใต้โขดหิน	N2	X		
3	ดินบริเวณรากต้นไม้	N3	X		
4	ดินบริเวณโคนต้นไม้	N4	X		
5	เศษไม้ผุและซีเมนต์	N5			X
6	เปลือกไม้	N6			X
7	มอส	N7			X
8	ดินบริเวณโคนต้นไม้	N8	X		
9	รากต้นเฟิร์น	N9			X
10	ดินบริเวณใต้ต้นไม้ริมทางเดิน	N10	X		
11	เปลือกไม้และเห็ด	N11			X
12	เปลือกไม้ มอส และไลเคน	N12			X
13	เห็ด	N13			X
14	เปลือกบนต้นโกสน	N14			X
15	ไลเคน	N15			X
16	ดินบริเวณรอยเดินปลวก	N16	X		
17	ดินรังปลวก	N17	X		

ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
18	ไม้ผุ	N18			X
19	เปลือกไม้และไลเคน	N19			X
20	ดินรังปลวก	N20	X		
21	เปลือกไม้และไลเคน	N21			X
22	น้ำบริเวณน้ำไหล	N22		X	
23	น้ำบริเวณน้ำนิ่ง	N23		X	
24	เปลือกไม้	N24			X
25	มอสและไลเคน	N25			X

ตารางที่ 3. 10 ข้อมูลตัวอย่างจากวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
1	ดินใต้ต้นโกงกางใบเล็ก ทางเข้า	SP1	X		
2	ดินโคลนในรูใต้ต้นโกงกางใบเล็ก	SP2	X		
3	สาหร่าย	SP3			X
4	ดินบริเวณป่าตะกาด	SP4	X		
5	ดินระหว่างใต้ต้นตะบูนดำโกงกางใบเล็ก	SP5	X		
6	ดินใต้ต้นโกงกางใบเล็ก บริเวณป่าเลนต่ำ	SP6	X		
7	เปลือกรากต้นถั่วขาว (มีสาหร่ายเกาะ)	SP7			X
8	ดินเลนป่าเลนต่ำ	SP8	X		
9	เปลือกไม้ผุบริเวณป่าเลนต่ำ	SP9			X

ตารางที่ 3.10 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
10	ดินโคลนใต้ต้นโกงกางใบเล็ก บริเวณป่าเลนสูง (ปากคลอง)	SP10	X		
11	ดินโคลนใต้รากโปรงแดง บริเวณป่าเลนสูง (ปากคลอง)	SP11	X		
12	ดินโคลนบริเวณปากคลองฝั่งตรงข้ามวนอุทยาน	SP12	X		
13	ดินโคลนบริเวณกลางคลอง	SP13	X		
14	ดินรังแม่หอบ บริเวณป่าเลนสูง	SP14	X		
15	ดินใบไม้ทับถมใต้ต้นตะบูนดำ	SP15	X		
16	ดินบริเวณรากต้นโกงกางใบเล็ก จุด 1	SP16	X		
17	ดินบริเวณรากต้นโกงกางใบเล็ก จุด 2	SP17	X		
18	ดินบริเวณแอ่งน้ำใต้ต้นโกงกางใบเล็ก	SP18	X		
19	ดินป่าโกงกาง 100 ปี จุดที่ 1	SP19	X		
20	ดินป่าโกงกาง 100 ปี จุดที่ 2	SP20	X		
21	ดินป่าโกงกาง 100 ปี จุดที่ 3	SP21	X		
22	เปลือกไม้ป่าโกงกาง 100 ปี	SP22			X
23	ดินป่าโกงกาง 100 ปี จุดที่ 4	SP23	X		
24	ดินป่าโกงกาง 100 ปี จุดที่ 5	SP24	X		
25	น้ำใต้ต้นโกงกางใบเล็ก บริเวณป่าเลนต่ำ	WP1		X	
26	น้ำบริเวณปากคลอง	WP2		X	

ตารางที่ 3.10 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	รายละเอียดตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง		
			ดิน	น้ำ	อื่น ๆ
27	น้ำบริเวณรากต้นโกกงกางใบเล็ก วนอุทยาน จุดที่ 1	WP3		X	
28	น้ำบริเวณรากต้นโกกงกางใบเล็ก วนอุทยาน จุดที่ 2	WP4		X	
29	น้ำบริเวณรากต้นโกกงกางใบเล็ก วนอุทยาน จุดที่ 3	WP5		X	
30	น้ำบริเวณป่าโกกงกาง 100 ปี จุดที่ 1	WP6		X	
31	น้ำบริเวณป่าโกกงกาง 100 ปี จุดที่ 2	WP7		X	
32	น้ำบริเวณป่าโกกงกาง 100 ปี จุดที่ 3	WP8		X	
33	น้ำบริเวณป่าโกกงกาง 100 ปี จุดที่ 4	WP9		X	
34	น้ำบริเวณป่าโกกงกาง 100 ปี จุดที่ 5	WP10		X	

3.5.2 จัดกลุ่มและการพิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์ที่คัดแยกได้

3.5.2.1 สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.5.1 ตามวิธีดัดแปลงจาก Cryer และคณะ (1975) โดยแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณ 1 ลูกบาศก์ในสารละลายไลซิส (lysis solution) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนโปรตีนในส่วนน้ำใส ด้วยสารผสมคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนน้ำใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำใสที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลเย็นปริมาตร 1 เท่าของส่วนน้ำใสที่ได้เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอ (DNA pellet) ที่ความเร็ว 14,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนอีกครั้งด้วยเอทานอล

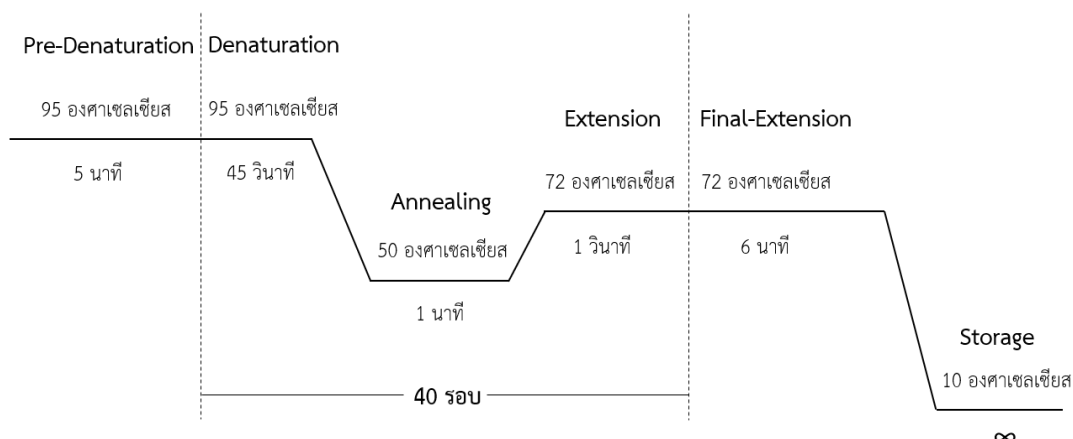
เข้มข้น 95% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิม ระบายแห้งตะกอนดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ในน้ำปราศจากไอออนปลอดเชื้อ (sterilized deionized water) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2.2 จัดกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) โดยเทคนิค repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR)

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีสต์ที่สกัดได้จากข้อ 3.5.2.1 ตามวิธีการของ Endoh และคณะ (2011) โดยใช้ไพรเมอร์ (GTG)₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') ส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10X Vi-buffer	2	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50 มิลลิโมลาร์)	0.8	ไมโครลิตร
dNTP (10 มิลลิโมลาร์)	0.2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ (GTG) ₅ (10 พิโคโมล)	1	ไมโครลิตร
Taq polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.12	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)	2	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	13.88	ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 40 รอบ ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ใช้ภาวะของการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 3.2 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 50 วัตต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วถ่ายภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentary system) จากนั้นจัดกลุ่มยีสต์โดยเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏ



ภาพที่ 3.1 ภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการจัดกลุ่มยีสต์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR)

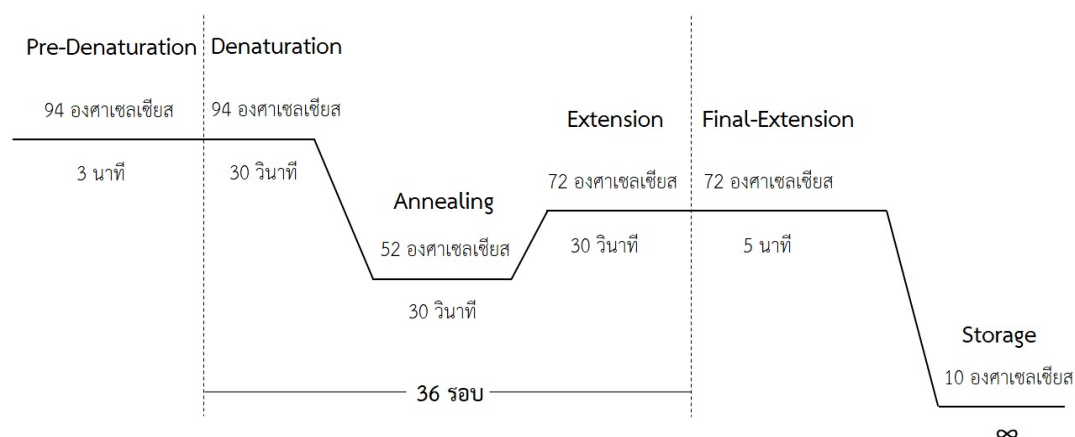
3.5.2.3 ระบุชนิดของยีสต์ด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ ยีน 26S rRNA

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ตัวแทนของแต่ละกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (จากข้อ 3.5.2.2) ตามวิธีการของ Endoh และคณะ (2008) โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ large subunit (LSU) ของยีน 26S rRNA ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอของยีสต์เป็น ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ใช้ไพรเมอร์ NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และไพรเมอร์ NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAG ACGG-3') เป็นไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด และไพรเมอร์ รีเวิร์ส ตามลำดับ (Kurtzman และ Robnett, 2003) ส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10X Vi-buffer	5	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (50 มิลลิโมลาร์)	3	ไมโครลิตร
dNTP (10 มิลลิโมลาร์)	0.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ NL1 (10 พิโคโมล)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ NL4 (10 พิโคโมล)	1	ไมโครลิตร
Taq polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)	5	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	34	ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 36 รอบ ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ภาวะของการทำปฏิกิริยาดังแสดง ในภาพที่ 3.2 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์สำเร็จรูป

(GeneaidTM, Taiwan) แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Bioneer Co. Ltd. ประเทศเกาหลี นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.2.5 (Hall, 1999) เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn บนเว็บไซต์ NCBI



ภาพที่ 3.2 ภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของยีน 26S rRNA

3.5.3 คัดกรองยีสต์อุดมไขมัน

3.5.3.1 คัดกรองเบื้องต้น

เพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ในกลุ่มจีเนสที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเป็น ยีสต์อุดมไขมัน ได้แก่ จีเนส *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Saitozyma*, *Papiliotrema*, *Naganishia*, *Kwoniella* และ *Debaryomyces* ซึ่งคัดแยกได้จากข้อ 3.5.1 และยีสต์อุดมไขมันสายพันธุ์ควบคุม *L. starkeyi* JCM 5995 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM สูตรดัดแปลงที่ลดปริมาณไนโตรเจนลง 20 เท่า ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 1% เพปโทน 0.025% สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.015% และสารสกัดจากมอลต์ 0.015% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตรวจสอบการมีไขมันสะสมในเซลล์เบื้องต้นโดยแขวนลอยยีสต์ 1 โคลินี่ในสารละลายสีฟลูออเรสเซนต์ไนล์เรด (nile red) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายไนล์เรดเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของอะซีโตน ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เข้มข้น 25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 99 ไมโครลิตร (Kimura และคณะ, 2004) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบหยดไขมันภายในเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่กัลังขยาย 1,000 เท่าผ่านฟิลเตอร์ U-WNB2 ที่มีค่า excitation และ emission ที่ช่วงความยาวคลื่น 470-490 และ 520 นาโนเมตร ตามลำดับ

คัดเลือกยีสต์ที่มีขนาดของหยดน้ำมันใหญ่มากกว่าครึ่งของเซลล์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.5.3.2 ผลิตน้ำมันเซลล์ยีสต์

นำยีสต์ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5.3.1 มาเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two stage fermentation) ดัดแปลงจาก Lin และคณะ (2014)

ขั้นแรกหรือขั้นเจริญ (growth stage) ถ้ายีสต์ลงในอาหารเหลว YM พีเอช 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลวชนิดเดิม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิม จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสองครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิมเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ยีสต์

ขั้นที่สองหรือขั้นผลิตน้ำมัน (oil production stage) ถ่ายโอนตะกอนเซลล์ยีสต์ทั้งหมดที่ได้จากขั้นแรกลงในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน (oil production medium หรือ OPM) ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเท่ากับ 62 ดัดแปลงจาก Galafassi และคณะ (2012) ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 5% สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.1% แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.005% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1% แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.001% และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.001% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 6 วัน ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสองครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิมเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ยีสต์

3.5.3.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์

นำเซลล์ยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.5.3.2 มาทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นสกัดน้ำมันจากเซลล์แห้งที่ได้ด้วยวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Folch และคณะ (1957) นำเซลล์แห้งปริมาณ 1 กรัมมาสกัดด้วยสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม: เมทานอล อัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex) นาน 20 วินาที แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (37 กิโลเฮิรตซ์) เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาเติมสารละลาย NaCl 0.73% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม นาน 15 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที

ดูดเก็บส่วนน้ำใสชั้นล่าง นำไปประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งน้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้ คำนวณหาปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ยีสต์ (oil content) แล้วคัดเลือกยีสต์อุดมน้ำมันที่มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์มากกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนักแห้งเซลล์แห้ง) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.4 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการของยีสต์อุดมน้ำมันที่คัดกรองได้

นำยีสต์อุดมน้ำมันที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5.3 มาศึกษาสัณฐานวิทยาของยีสต์โดยใช้วิธีมาตรฐานตามหนังสือ The Yeasts, Fifth Edition: A Taxonomic Study (Kurtzman และคณะ, 2011) โดยศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเหลว ลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารแข็งด้วยตาเปล่า ศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ รูปร่าง ขนาด และการแตกหน่อ ศึกษาการสร้างเส้นใยแท้ (true hyphae) และ เส้นใยเทียม (pseudohyphae) ด้วยเทคนิค Dalmau slide culture และตรวจหาหยดน้ำมันภายในเซลล์โดยการย้อมด้วยสีไนล์เรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

3.5.5 คัดเลือกยีสต์อุดมน้ำมันที่สามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักในไฮโดรไลเสตจากลิกโนเซลลูโลสเพื่อการเจริญ

นำยีสต์อุดมน้ำมันที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5.3 มาทดสอบความสามารถเจริญในน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกาแล็กโทส น้ำตาลอะราบิโนส และน้ำตาลเซลโลไบโอสโดยใช้ชุดทดสอบ API-ID32 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.6 เตรียมไฮโดรไลเสตไบอ้อย

3.5.6.1 เตรียมตัวอย่างไบอ้อย

นำไบอ้อยมาตัด บดด้วยเครื่องบดแบบฆ้อนเหวี่ยง (hammer-mill) และนำไปร่อนเพื่อเก็บอนุภาคขนาด 20-40 เมช (ภาพที่ 3.3) แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นส่งไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เช่น เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry) (Tappi T221 om-02, 2002; Tappi T203 cm-99, 2009; Tappi T222 om-15, 2015) ที่กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม



ภาพที่ 3.3 อนุภาคไบอ้อยขนาด 20-40 เมช

3.5.6.2 เตรียมไฮโดรไลเสตไบอ้อย

ปรับสภาพและเตรียมไฮโดรไลเสตไบอ้อยตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Jutakanoke และคณะ (2012) โดยแขวนลอยอนุภาคไบอ้อย 6% และ 12% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ปรับพีเอชเป็น 5.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 2200 – 2800 คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC) ยูนิท/กรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองแยกกากออกด้วยผ้าขาวบางแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสซึ่งเป็นไฮโดรไลเสตไบอ้อย แทนสัญลักษณ์ด้วย 6%-SLH หรือ 12%-SLH (ภาพที่ 3.4) จากนั้นปรับพีเอชเป็น 5.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง (filter sterilization) ด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ (syringe filter) ที่มีขนาดรูพรุน (pore size) 0.22 ไมโครเมตร เพื่อใช้เป็นอาหารไฮโดรไลเสตไบอ้อยในการทดลองขั้นต่อไป

3.5.6.3 กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ในไฮโดรไลเสตไบอ้อยโดยวิธีปรับต่างเกิน (overliming)

นำไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.6.2 มาปรับต่างเกิน (overliming) ตามวิธีของ Yu และคณะ (2011) โดยการปรับค่าพีเอชของ 6%-SLH หรือ 12%-SLH ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) เป็น 10 บ่มแบบเขย่าที่ 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสจะได้ไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ แทนสัญลักษณ์ด้วย 6%-DSLH หรือ 12%-DSLH จากนั้นปรับพีเอชเป็น 5.5 และทำให้ปราศจากเชื้อ เช่นเดียวกับข้อ 3.5.6.2 เพื่อใช้เป็นอาหารไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.4 แผนผังแสดงวิธีเตรียมไฮโดรไลเสตใบอ้อย

3.5.6.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตใบอ้อย

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพแบบหลายพารามิเตอร์ (multiparameter bioanalytical system) ส่งวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกาแล็กโตส น้ำตาลอะราบินอส น้ำตาลเซลโลโบไอส ด้วยเทคนิค HPLC (Akaracharanya และคณะ, 2011) ปริมาณไนโตรเจนด้วยเทคนิค Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) ปริมาณสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ คือ เฟอฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรัล (hydroxymethylfurfural) ด้วยเทคนิค HPLC (Bhatia และคณะ, 2017) ที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่งวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารรอง ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส คอปเปอร์ สังกะสี แคลเซียม แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ด้วยเทคนิคการดูดกลืนแสงของอะตอม (atomic absorption spectrometry) และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดด้วยเทคนิค ascorbic acid (Rice และคณะ, 2012) ที่สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.7 ผลิตน้ำมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตใบอ้อย

นำยีสต์อุดมไขมัน 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.3 มาผลิตน้ำมันโดยใช้ไฮโดรไลเสตใบอ้อยเป็นวัตถุดิบด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน

3.5.7.1 ขั้นแรกหรือขั้นเจริญ (growth stage) ในอาหารไฮโดรไลเสตใบอ้อย

เพาะเลี้ยงยีสต์อุดมไขมันที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5.3.3 ในอาหารไฮโดรไลเสตใบอ้อย (6%-SLH หรือ 6%-DSLH) จากข้อ 3.5.6 ที่เติมสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.3% และเพปโทน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นเริ่มต้นของยีสต์ให้มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.8 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารไฮโดรไลเสตใบอ้อยชนิดเดิมบ่มที่ภาวะเดิม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บ่มเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสองครั้ง แล้วบ่มเหวี่ยงที่ภาวะเดิมเพื่อเก็บตะกอนเซลล์สำหรับใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในขั้นผลิตน้ำมันต่อไป

3.5.7.2 ขั้นที่สองหรือขั้นผลิตน้ำมัน (oil production stage) ในอาหารไฮโดรไลเสตใบอ้อย

ถ่ายโอนตะกอนเซลล์ยีสต์ทั้งหมดจากขั้น 3.5.7.1 ลงในไฮโดรไลเสตใบอ้อย (12%-SLH หรือ 12%-DSLH) ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 4

วัน ปั่นเหรียญเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสองครั้ง แล้วปั่นเหรียญที่ภาวะเดิมเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นทำให้เซลล์แห้งแบบเยือกแข็ง นำเซลล์แห้งที่ได้ไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ตามวิธีข้อ 3.5.3.3

3.5.8 หาภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบอ้อยของยีสต์อุดมน้ำมัน สายพันธุ์ที่ผลิตน้ำมันได้สูงที่สุดจากข้อ 3.5.7

ผลิตน้ำมันยีสต์ในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (ตามวิธีข้อ 3.5.7) จากนั้นแปรผันอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเริ่มต้นของไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่คัดเลือกได้เป็น 24, 60 และ 106 โดยเติมน้ำตาลทรายดิบ (raw sugar) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 460 กรัม/ลิตร น้ำตาลไซโลส 94.66 กรัม/ลิตร และไนโตรเจนทั้งหมด 0.5 กรัม/ลิตร ลงไป แล้วศึกษาผลของการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 0, 1, 5, 10 และ 20 กรัม/ลิตร ลงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่คัดเลือกได้ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเริ่มต้นที่เหมาะสม จากนั้นศึกษาผลของการเติมธาตุอาหารรอง (trace elements) จำนวน 4 ปัจจัย ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) เพอร์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และ/หรือ ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โดยออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman กำหนดค่าระดับของแต่ละปัจจัยที่เติมลงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่คัดเลือกได้ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเริ่มต้นและปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม เป็น 2 ระดับ คือ ระดับต่ำ และระดับสูง ซึ่งแทนด้วยสัญลักษณ์ - และ + ตามลำดับ (ตารางที่ 3.11) นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ Statistica™ (Tibco software Inc., USA) เพื่อวิเคราะห์หาค่าผลตอบสนอง (Effect) และค่าความน่าจะเป็น (P-value) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% จากนั้นแปรผันพีเอชเริ่มต้นของไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่คัดเลือกได้ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเริ่มต้นและปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม มีชนิดและปริมาณของธาตุอาหารรองที่เหมาะสม เลือกใช้ปัจจัยที่ยีสต์สามารถให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุดของการทดลองก่อนหน้าในการทดลองถัดไป แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้ในภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันที่ได้

ตารางที่ 3.11 ปัจจัย และค่าระดับของปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman

ปัจจัย	สัญลักษณ์	หน่วย	ระดับของปัจจัย	
			ต่ำ (-)	สูง (+)
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต	X1	กรัม/ลิตร	0	0.3
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	X2	กรัม/ลิตร	0	0.003
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต	X3	กรัม/ลิตร	0	0.1
ซิงค์ซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต	X4	กรัม/ลิตร	0	0.02

3.5.9 หาภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบออยของยีสต์อูดม้ำมัน

Cy. subsufficiens NG8.2

เนื่องจากน้ำมันของยีสต์อูดม้ำมัน *Cy. subsufficiens* NG8.2 มีกรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) ซึ่งเป็นกรดไขมันราคาแพงปริมาณมาก (รัชนา พระนิมิตร, 2560) งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 จากไฮโดรไลเสตไบออย และองค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้ที่ภาวะเหมาะสมที่สุด

หาภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 จากไฮโดรไลเสตไบออย โดยผลิตน้ำมันยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 จากไฮโดรไลเสตไบออย ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ตามวิธีการข้อ 3.5.7 ขึ้นเจริญใช้อาหารไฮโดรไลเสตไบออย (6%-SLH) ที่เติมสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.3% และเพปโทน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ขึ้นการผลิตน้ำมันเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ในไฮโดรไลเสตไบออย (12%-SLH) และ 12%-SLH ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสจำกัด (12%-DSLH) หาอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบออยที่คัดเลือกได้ โดยการแปรผันอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเริ่มต้นของไฮโดรไลเสตไบออยที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบการเติมและไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต (0, 0.5, 0.75 และ 1 กรัม/ลิตร) ลงในไฮโดรไลเสตไบออยที่คัดเลือกได้ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเริ่มต้นที่เหมาะสม จากนั้นแปรผันพีเอชเริ่มต้นของไฮโดรไลเสตไบออยที่คัดเลือกได้ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเริ่มต้น และมีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรตที่เหมาะสม เท่ากับ 4.5, 5.5 และ 6.0 เลือกใช้ปัจจัยที่ยีสต์สามารถให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุดของการทดลองก่อนหน้าในการทดลองถัดไป แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้ในภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมันที่ได้

3.5.10 วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

นำผลปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมันที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้การทดสอบ Duncan ด้วยโปรแกรม IBM SPSS® Statistics 22 สำหรับระบบปฏิบัติการวินโดวส์ (SPSS Inc. Chicago, USA)

3.5.11 วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้

วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันยีสต์ที่ผลิตได้ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) (Anamnart และคณะ, 1998; Limsuwatthanathamrong และคณะ, 2012) ขั้นแรกสกัดและเปลี่ยนน้ำมันให้อยู่ในรูปของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (fatty acid methyl ester, FAMES) โดยวิธีทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) นำเซลล์ยีสต์เปียกปริมาณ 1 กรัมมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในเมทานอล ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดเก็บส่วนสารละลาย มาเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นสกัดกรดไขมันด้วยไดเอทิลอีเธอร์อีกครั้ง ดูดเก็บส่วนสารละลายกรดไขมัน ระเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยใช้วิธีการเป่าแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันโดยเติมสารละลายผสมโบรอนไตรฟลูออไรด์และเมทานอล (BF₃/MeOH) ลงในกรดไขมันที่สกัดได้ สกัดแยก FAMES ด้วยสารละลายเฮกเซน แล้ววิเคราะห์ FAMES ด้วยเทคนิค GC-FID (gas chromatography-flame ionization detector) ที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นคำนวณผลร้อยละโดยมวลของกรดไขมันที่ได้เทียบกับกรดไขมันมาตรฐาน

3.5.12 คำนวณค่าสมบัติไบโอดีเซลของน้ำมันยีสต์ที่ผลิตได้

คำนวณค่าสมบัติต่าง ๆ ของไบโอดีเซล ได้แก่ ความหนืด (viscosity) ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) จุดหมอก (cloud point) เลขซีเทน (cetane number) เลขไอโอดีน (iodine number) และค่าความร้อนสูง (higher heating value) ตามวิธีการของ Hoekman และคณะ (2012) โดยใช้ข้อมูลชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันยีสต์ที่วิเคราะห์ได้ โดยขั้นแรกคำนวณหาค่าเฉลี่ยความไม่อิ่มตัวของกรดไขมัน (average unsaturation, AU) ดังสมการที่ 3.1

$$AU = \sum N \times C_i \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

โดยที่ N คือ จำนวนพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) และ C_i คือ ความเข้มข้นโดยมวลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดนั้น ๆ

จากนั้นคำนวณค่าสมบัติต่าง ๆ ของไบโอดีเซล ดังสมการที่ 3.2 – 3.7

$$\text{ความหนืด (ตารางมิลลิเมตร/วินาที)} = -0.6316AU + 5.2065 \quad \text{สมการที่ 3.2}$$

$$\text{ความถ่วงจำเพาะ} = 0.0055AU + 0.8726 \quad \text{สมการที่ 3.3}$$

$$\text{จุดหมอก (องศาเซลเซียส)} = -13.356AU + 19.994 \quad \text{สมการที่ 3.4}$$

$$\text{เลขซีเทน} = -6.6684AU + 62.876 \quad \text{สมการที่ 3.5}$$

$$\text{เลขไอโอดีน} = 74.373AU + 12.71 \quad \text{สมการที่ 3.6}$$

$$\text{ค่าความร้อนสูง (เมกะจูล/กิโลกรัม)} = 1.7601AU + 38.534 \quad \text{สมการที่ 3.7}$$

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกยีสต์

ยีสต์จำนวนทั้งหมด 223 ไอโซเลตถูกคัดแยกได้จากตัวอย่างดิน น้ำ และวัสดุชีวภาพอื่น ๆ จากแหล่งธรรมชาติ 9 แห่ง จำนวนรวม 223 ตัวอย่าง บนอาหาร nitrogen depleted medium (NDM) โดยแบ่งตามแต่ละแหล่งตัวอย่างดังนี้ ตัวอย่างจำนวน 22 ตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1) ตัวอย่างจำนวน 26 ตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.2) ตัวอย่างจำนวน 22 ตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.3) ตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 25 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.4) ตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง จำนวน 24 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.5) ตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด จำนวน 25 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 17 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.6) ตัวอย่างจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง จำนวน 20 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.7) ตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จังหวัดระนอง จำนวน 25 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.8) และยีสต์จำนวน 35 ไอโซเลตแยกได้จาก 34 ตัวอย่างจากวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.1 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัด
จันทบุรี

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
WW1	WW1.2
WW2	WW2.1
WW3	WW3.1
WW8	WW 8.2
WS2	WS2.1
WS3	WS3.2
WS6	WS6.1
WS7	WS7.5, WS7.3, WS7.7.2
WT3	WT1.3
WT5	WT5.1
WW4, WW5, WW6, WW7, WS1, WS4, WS5, WT1, WT2, WT4, WT6, WT7	-
จำนวนรวม (ไอโซเลต)	12

ตารางที่ 4.2 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัด
ตราด

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
BS1	BS1.1
BS3	BS3.1
BS5	BS5.1
BS8	BS8.3
BS9	BS9.3
BW1	BW1.3, BW1.2
BW3	BW3.3.1, BW3.4

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
BW4	BW4.2, BW4.1, BW4.5.2, BW4.5.1
BW5	BW5.2, BW5.6, BW5.4
BW6	BW6.2, BW6.4, BW6.1, BW6.8
BW7	BW7.3, BW7.1, BW7.4, BW7.5
BW8	BW8.1, BW8.5, BW8.4
BW9	BW9.1, BW9.6, BW9.3
BS2, BS4, BS6, BS7, BS10, BS11, BT1, BT2, BT3, BT4, BT5, BW2, BW10	-
จำนวนรวม (ไอโซเลต)	30

ตารางที่ 4.3 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
SB1	NSB1-1, NSB1-2
SB2	NSB2-1, NSB2-2
SB3	NSB3-1, NSB3-2
SB6	NSB6-1, NSB6-2
SB7	NSB7-1
SB8	NSB8-1
SB9	NSB9-1
SB10	NSB10-1
WB1	NWB1-1
WB2	NWB2-1, NWB2-2, NWB2-3

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

WB3	NWB3-1
WB4	NWB4-1
WB5	NWB5-1
WB6	NWB6-1, NWB6-4
WB7	NWB7-1
SB4, SB5, SB11, SB12, SB14, SB14, WB8	-
จำนวนรวม (ไอโซเลต)	22

ตารางที่ 4.4 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
SK3	NSK3-1, NSK3-2
SK5	NSK5-1
SK6	NSK6-1
SK7	NSK7-1
SK9	NSK9-2
SK10	NSK10-1
SK12	NSK12-1
SK13	NSK13-2
SK14	NSK14-1
SK15	NSK15-2
SK17	NSK17-1, NSK17-3
WK2	NWK2-1, NWK2-3
WK4	NWK4-1, NWK4-2

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
WK5	NWK5-2
WK8	NWK8-1
SK1, SK2, SK4, SK8, SK11, SK16, WK1, WK3, WK6, WK7	
จำนวนรวม (ไอโซเลต)	19

ตารางที่ 4.5 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
R11-1	R11-1.1
R11-2	R11-2.5, R11-2.2
R11-3	R11-3.1
R11-4	R11-4.1
R11-6	R11-6.1.1, R11-6.1.2
R11-7	R11-7.2
R11-8	R11-8.2
R11-11	R11-11.3.1
R11-12	R11-12.2, R11-12.1
R11-14	R11-14.1, R11-14.2, R11-14.4, R11-14.5, R11-14.6, R11-14.7
R11-15	R11-15.5.1, R11-15.3, R11-15.6, R11-15.7.1, R11-15.8
R11-16	R11-16.1
R11-17	R11-17.2

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
R11-18	R11-18.2
R11-1W	R11-1W.1, R11-1W1.1, R11-1W.5
R11-2W	R11-2W.2, R11-2W.1, R11-2W.7, R11-2W.4
R11-3W	R11-3W.4, R11-3W.2
R11-10W	R11-10W.3
R11-5, R11-9, R11-10, R11-13, R11-9W, R11-11W	-
จำนวนรวม (ไอโซเลต)	37

ตารางที่ 4.6 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
MTS1	MTS1.1.2
MTS4	MTS4.4
MTT3	MTT3.1.4, MTT3.2, MTT3.1
MTT4	MTT4.1
MTT5	MTT5.1.2
MTW3	MTW3.1.2, MTW3.1.3
MTW4	MTW4.3
MTW6	MTW6.1.1
MTW8	MTW8.1
MTW9	MTW9.2
MTW10	MTW10.1, MTW10.3, MTW10.4
MTW11	MTW11.1

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
MTS2, MTS3, MTS5, MTS6, MTS7, MTT1, MTT2, MTW1, MTW2, MTW5, MTW7, MTW12, MTW13	-
จำนวนรวม (ไอโซเลต)	17

ตารางที่ 4.7 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากพื้นที่สงวนชีวมณฑล จังหวัดระนอง

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
R1-1	R1-1.2, R1-1.3
R1-3	R1-3.1, R1-3.3
R1-4	R1-4.3
R1-6	R1-6.4, R1-6.3, R1-6.9, R1-6.6
R1-12	R1-12.1
R1-2W	R1-2W.1
R1-3W	R1-3W.1, R1-3W.6.4, R1-3W.8, R1-3W.5.3, R1-3W.6.3, R1-3W.2
R1-4W	R1-4W.1, R1-4W.4
R1-5W	R1-5W.5.1, R1-5W.5.2, R1-5W.3, R1-5W.4
R1-7W	R1-7W.1, R1-7W.8, R1-7W.2
R1-8W	R1-8W.2, R1-8 W.1
จำนวนรวม (ไอโซเลต)	27

ตารางที่ 4.8 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จังหวัดระนอง

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต
N1	N1.1.1, N1.3, N1.4
N3	N3.2
N5	N5.1.2
N6	N6.2
N7	N7.1, N7.3.1
N8	N8.4, N8.2.1, N8.5, N8.7, N8.8
N12	N12.3, N12.2, N12.1, N12.5
N13	N13.3, N13.2
N14	N14.1
N15	N15.3
N16	N16.1, N16.1.2, N16.2
N23	N2W.7.2
N2, N4, N9, N10, N11, N17, N18, N19, N20, N21, N22, N24, N25	-
จำนวนรวม (ไอโซเลต)	24

ตารางที่ 4.9 จำนวนและรหัสไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

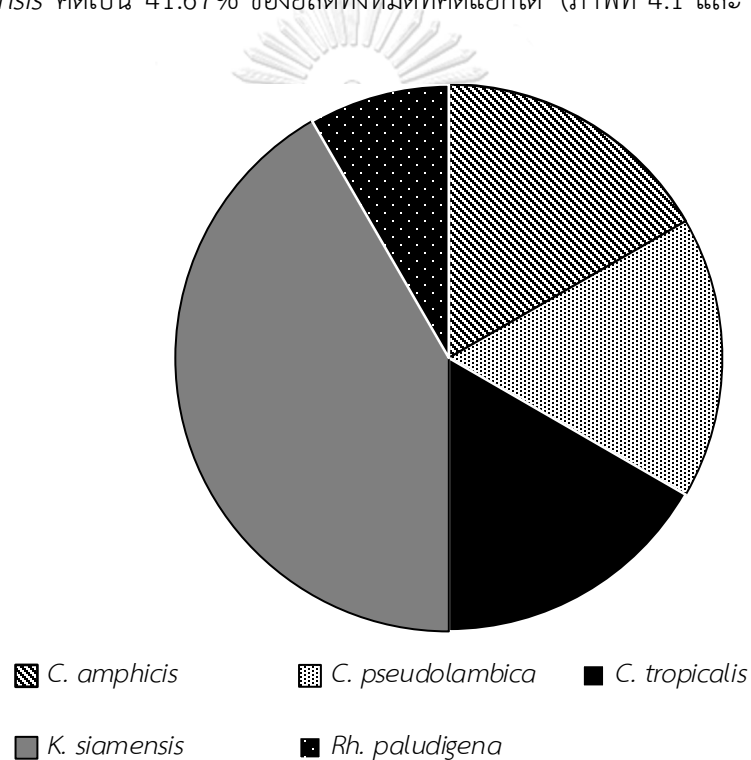
รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลตยีสต์ที่คัดแยกได้
SP1	NSP1-2
SP2	NSP2-1
SP6	NSP6-1
SP8	NSP8-1
SP9	NSP9-1
SP10	NSP10-1, NSP10-2

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	รหัสไอโซเลตยีสต์ที่คัดแยกได้
SP11	NSP11-1, NSP11-2, NSP11-3
SP12	NSP12-1
SP14	NSP14-2
SP15	NSP15-1, NSP15-2
SP16	NSP16-2, NSP16-3
SP18	NSP18-1
SP19	NSP19-1
SP20	NSP20-1, NSP20-2
SP21	NSP21-1
SP22	NSP22-1, NSP22-3, NSP22-5
SP23	NSP23-1
SP24	NSP24-1, NSP24-2
WP2	NWP2-1
WP4	NWP4-1
WP5	NWP5-1, NWP5-2
WP7	NWP7-1, NWP7-2
WP8	NWP8-1
WP10	NWP10-1
SP3, SP4, SP5, SP7, SP13, SP17, WP1, WP3, WP6, WP9	-
จำนวนรวม (ไอโซเลต)	35

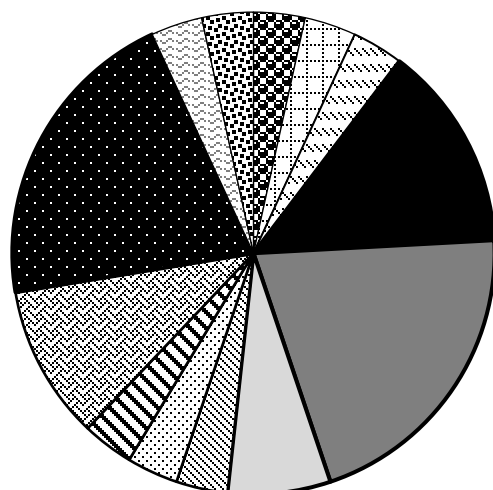
4.2 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้

ยีสต์ทั้งหมดที่คัดแยกได้จากตัวอย่างแต่ละแหล่งถูกจัดกลุ่มตามรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR) จากนั้นเลือกตัวแทนของยีสต์แต่ละกลุ่มแบบสุ่มเพื่อระบุเอกลักษณ์ของยีสต์ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 บนยีน 26S rRNA ซึ่งผลการศึกษาพบว่ายีสต์จำนวน 12 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี สามารถจำแนกได้เป็นยีสต์ทราบชนิด (known species) ทั้งหมด 3 จีนัส 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida amphicis*, *C. pseudolambica*, *C. tropicalis*, *Kluyveromyces siamensis* และ *Rhodotorula paludigena* สปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *K. siamensis* คิดเป็น 41.67% ของยีสต์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ (ภาพที่ 4.1 และ ตารางที่ ค.1)



ภาพที่ 4.1 แผนภูมิแสดงจำนวนจีนัสและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี

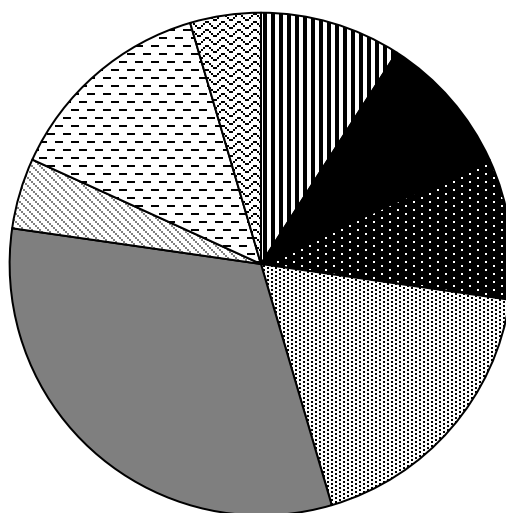
ยีสต์ทั้งหมด 30 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด สามารถจำแนกชนิดได้เป็นยีสต์ทราบชนิด จำนวน 9 จี๊นัส 12 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida nonsorbophila*, *C. orthopsilosis*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *Kluyveromyces siamensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Papiliotrema flavescens*, *Pichia chibodasensis*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Rh. paludigena* และ *Schwanniomyces polymorphus* และ สปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ *K. siamensis* (20%) และ *Rh. paludigena* (20%) นอกจากนี้ยังพบยีสต์ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ต่างจากยีสต์ทราบชนิดมากกว่า 6 นิวคลีโอไทด์ หรือมากกว่า 1% ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด ซึ่งคาดว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ (new species) (Kurtzman และ Robnett, 1998) จำนวน 1 สปีชีส์ คือ *Candida* aff. (affinis) *californica* จำนวน 1 สายพันธุ์ (ภาพที่ 4.2 และ ตารางที่ ค.2)



- | | |
|--|---|
|  <i>C. nonsorbophila</i> |  <i>C. orthopsilosis</i> |
|  <i>C. thaimueangensis</i> |  <i>C. tropicalis</i> |
|  <i>K. siamensis</i> |  <i>Ko. Ohmeri</i> |
|  <i>Me. Guilliermondii</i> |  <i>Pap. flavescens</i> |
|  <i>P. chibodasensis</i> |  <i>Ps. Hubeiensis</i> |
|  <i>Rh. paludigena</i> |  <i>Sch. Polymorphus</i> |
|  <i>Candida</i> aff. <i>californica</i> | |

ภาพที่ 4.2 แผนภูมิแสดงจำนวนจี๊นัสและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด

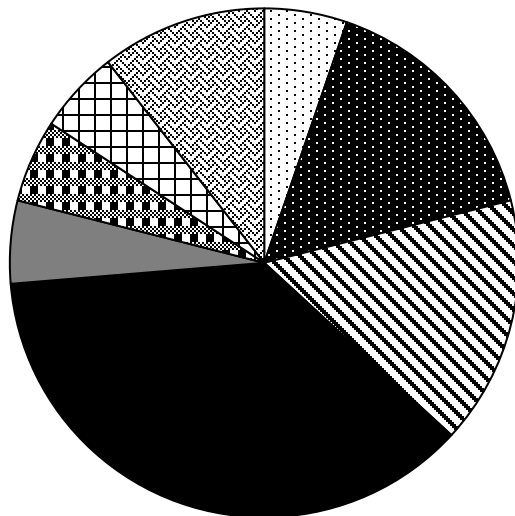
ยีสต์ทั้งหมด 22 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี สามารถจำแนกชนิดได้เป็นยีสต์ทราบชนิด จำนวน 5 จีนัส 8 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces nepalensis*, *Kluyveromyces aestuarii*, *K. siamensis*, *Pichia anomala*, *P. kudriavzevii* และ *Yamadazyma mexicana* สปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ *K. siamensis* คิดเป็น 31.81% ของยีสต์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ (ภาพที่ 4.3 และ ตารางที่ ค.3)



- | | | |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|
| ▨ <i>C. thaimueangensis</i> | ■ <i>C. tropicalis</i> | ● <i>De. Nepalensis</i> |
| ▩ <i>K. aestuarii</i> | ■ <i>K. siamensis</i> | ▧ <i>P. anomala</i> |
| ▤ <i>P. kudriavzevii</i> | ▨ <i>Ya. Mexicana</i> | |

ภาพที่ 4.3 แผนภูมิแสดงจำนวนจีนัสและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจาก สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี

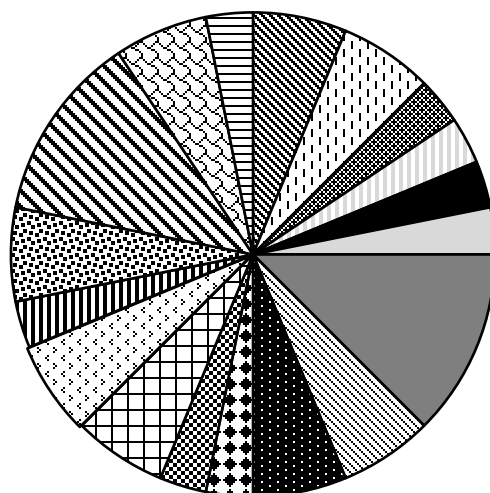
ยีสต์จำนวน 19 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม สามารถจำแนกชนิดได้เป็นยีสต์ทราบชนิด จำนวน 4 จีนัส 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Ambrosiozyma monospora*, *Candida insectorum*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *Kluyveromyces siamensis* และ *Ya. mexicana* และยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida aff. ecuadorensis* จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *Candida aff. quercuum* จำนวน 2 สายพันธุ์ ยีสต์ทราบชนิดที่พบมากที่สุด คือ *C. tropicalis* คิดเป็น 36.84% ของยีสต์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ (ภาพที่ 4.4 และ ตารางที่ ค.4)



- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| A. monospora | C. insectorum |
| C. thaimueangensis | C. tropicalis |
| K. siamensis | Ya. Mexicana |
| Candida aff. ecuadorensis | Candida aff. quercuum |

ภาพที่ 4.4 แผนภูมิแสดงจำนวนจีंसและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนา
ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม

ผลการจำแนกชนิดของยีสต์จำนวน 37 ไอโซเลตที่ถูกคัดแยกจากตัวอย่างจากสถานีพัฒนา
ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง สามารถจำแนกชนิดได้เป็นยีสต์ทราบชนิด จำนวน 10 จีंस
17 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida maltose*, *C. pseudolambica*, *C. silvanorum*, *C. thaimueangensis*,
C. tropicalis, *Hannaella phetchabunensis*, *Kluyveromyces siamensis*, *Kwoniella*
dejecticola, *Metahyphopichia laotica*, *Naganishia albida*, *Nag. liquefaciens*,
Papiliotrema flavescens, *Rhodotorula mucilaginoso*, *Rh. paludigena*, *Rh.*
sphaerocarpa, *Saitozyma podzolica* Sait. *podzolica* และ *Schwanniomyces vanrijiae*
var. *vanrijia* และยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida* aff. *silvanorum* จำนวน 2 สายพันธุ์
และ *Goffeauzyma* aff. *gilvescens* จำนวน 1 สายพันธุ์ ยีสต์ทราบชนิดที่พบมากที่สุด คือ *K.*
siamensis (10.81%) และ *S. vanrijiae* var. *vanrijia* (10.81%) (ภาพที่ 4.5 และ ตารางที่ ค.5)

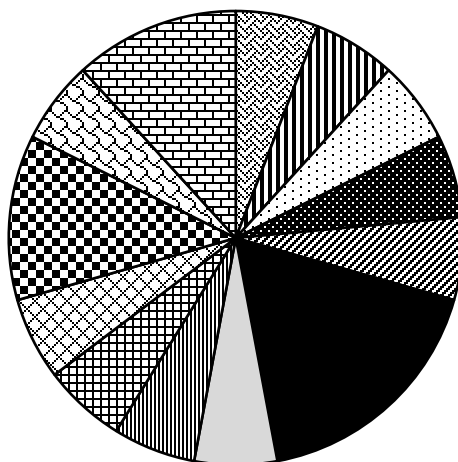


- | | |
|----------------------------------|---|
| ▨ <i>C. maltose</i> | ▨ <i>C. pseudolambica</i> |
| ▨ <i>C. silvanorum</i> | ▨ <i>C. thaimueangensis</i> |
| ▨ <i>C. tropicalis</i> | ▨ <i>H. phetchabunensis</i> |
| ▨ <i>K. siamensis</i> | ▨ <i>Kw. Dejecticola</i> |
| ▨ <i>Me. Laotica</i> | ▨ <i>Nag. albida</i> |
| ▨ <i>Pap. flavescens</i> | ▨ <i>Rh. mucilaginoso</i> |
| ▨ <i>Rh. paludigena</i> | ▨ <i>Rh. sphaerocarpa</i> |
| ▨ <i>Sait. Podzolica</i> | ▨ <i>Sch. vanrijiae</i> var. <i>vanrijiae</i> |
| ▨ <i>Candida aff. silvanorum</i> | ▨ <i>Goffeauzyma aff. gilvescens</i> |

ภาพที่ 4.5 แผนภูมิแสดงจำนวนจีสและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจาก สถานีพัฒนา
ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง

CHULALONGKORN UNIVERSITY

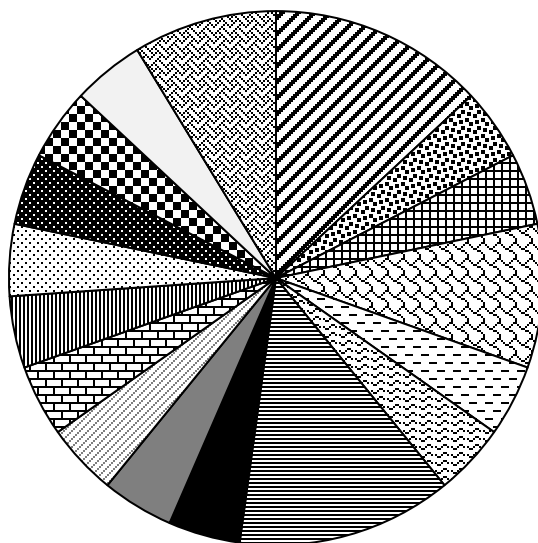
ยีสต์ทั้งหมด 17 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45
จังหวัดตราด สามารถจำแนกชนิดได้เป็นยีสต์ทราบชนิด จำนวน 6 จีส 11 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida*
cylindracea, *C. insectorum*, *C. pseudolambica*, *C. sithepensis*, *C. thaimueangensis*, *C.*
tropicalis, *Debaryomyces nepalensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Papiliotrema laurentii*, *Pichia*
chibodasensis และ *Rhodotorula paludigena* และยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Sakaguchia*
aff. lamellibrachiae จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *Candida aff. californica* จำนวน 2 สายพันธุ์
(ตารางที่ 4.15) ยีสต์ทราบชนิดที่พบมากที่สุด คือ *C. tropicalis* คิดเป็น 17.65% ของยีสต์ทั้งหมดที่
คัดแยกได้ (ภาพที่ 4.6 และ ตารางที่ ค.6)



- | | |
|---------------------------------|--|
| <i>C. cylindracea</i> | <i>C. insectorum</i> |
| <i>C. pseudolambica</i> | <i>C. sithepensis</i> |
| <i>C. thaimueangensis</i> | <i>C. tropicalis</i> |
| <i>De. Nepalensis</i> | <i>Ko. Ohmeri</i> |
| <i>Pap. laurentii</i> | <i>P. chibodasensis</i> |
| <i>Rh. paludigena</i> | <i>Sakaçuchia aff. lamellibrachiae</i> |
| <i>Candida aff. californica</i> | |

ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแสดงจำนวนจีสและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสถานีพัฒนา
ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด

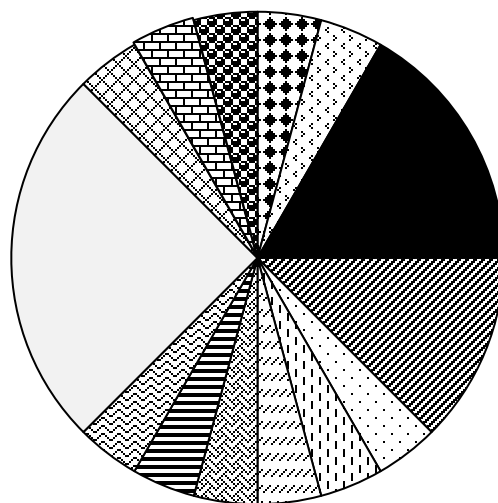
ยีสต์จำนวน 27 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง
สามารถจำแนกชนิดได้เป็นยีสต์ทราบชนิด จำนวน 9 จีส 17 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida aaseri*,
C. cylindracea, *C. insectorum*, *C. intermedia*, *C. pseudolambica*, *C. sorboxylosa*, *C.*
thaimueangensis, *C. tropicalis*, *Kluyveromyces siamensis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia*
occidentalis, *P. sporocuriosa*, *Papiliotrema laurentii*, *Rhodotorula paludigena*,
Rhodospiridium toruloides, *Saitozyma podzolica* และ *Suhomyces atakaporum* โดยสปี
ชีส์ที่พบมากที่สุด คือ *C. aaseri* (11.11%) และ *C. thaimueangensis* (11.11%) (ภาพที่ 4.7 และ
ตารางที่ ค.7)



- | | | |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| ▨ <i>C. aaseri</i> | ▩ <i>C. cylindracea</i> | ▧ <i>C. insectorum</i> |
| ▩ <i>C. intermedia</i> | ▨ <i>C. pseudolambica</i> | ▩ <i>C. sorboxylosa</i> |
| ▨ <i>C. thaimueangensis</i> | ■ <i>C. tropicalis</i> | ▩ <i>K. siamensis</i> |
| ▨ <i>Ko. Ohmeri</i> | ▨ <i>Pap. laurentii</i> | ▨ <i>P. occidentalis</i> |
| ▩ <i>P. sporocuriosa</i> | ▩ <i>Rh. paludigena</i> | ▩ <i>R. toruloides</i> |
| □ <i>Sait. Podzolica</i> | ▩ <i>Su. Atakaporum</i> | |

ภาพที่ 4.7 แผนภูมิแสดงจำนวนยีสต์และสปอร์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง

ผลการจำแนกชนิดของยีสต์จำนวน 24 ไอโซเลตที่ถูกคัดแยกจากตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติน้ำตก หงาว จังหวัดระนอง สามารถจำแนกชนิดได้เป็นยีสต์ทราบชนิด จำนวน 6 ยีสต์ 12 สปอร์ได้แก่ *Candida diversa*, *C. tropicalis*, *C. silvanorum*, *C. zeylanoides*, *Papiliotrema flavescens*, *Pap. laurentii*, *Pichia manshurica*, *P. sporocuriosa*, *P. terricola*, *Rhodospiridium toruloides*, *Saitozyma podzolica* และ *Schwanniomyces varrijiae* และยีสต์สปอร์ใหม่ของ 2 ยีสต์ ได้แก่ *Colacogloea aff. terpenoidalis* และ *Rhodotorula aff. paludigenum* ยีสต์ทราบชนิดที่พบมากที่สุด คือ *Sait. Podzolica* คิดเป็น 25% ของยีสต์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ (ภาพที่ 4.8 และ ตารางที่ ค.8)

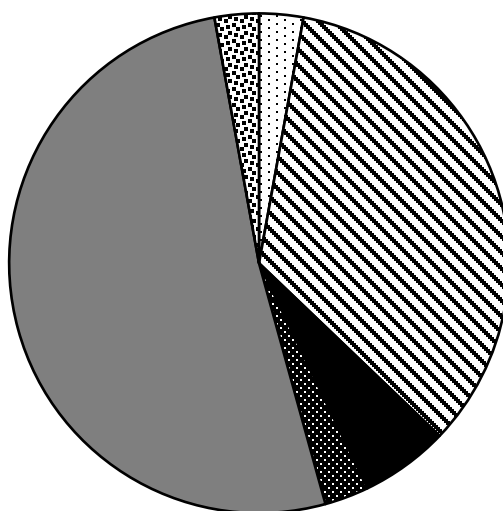


- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| <i>C. diversa</i> | <i>C. silvanorum</i> |
| <i>C. tropicalis</i> | <i>C. zeylanoides</i> |
| <i>Pap. flavescens</i> | <i>Pap. laurentii</i> |
| <i>P. manshurica</i> | <i>P. sporocuriosa</i> |
| <i>P. terricola</i> | <i>R. toruloides</i> |
| <i>Sait. Podzolicus</i> | <i>Sch. Vanriijae</i> |
| <i>Colacogloea aff.</i> | <i>Rhodotorula aff. paludigenum</i> |

ภาพที่ 4.8 แผนภูมิแสดงจำนวนจีสและสปอร์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติ น้ำตกหงาว จังหวัดระนอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

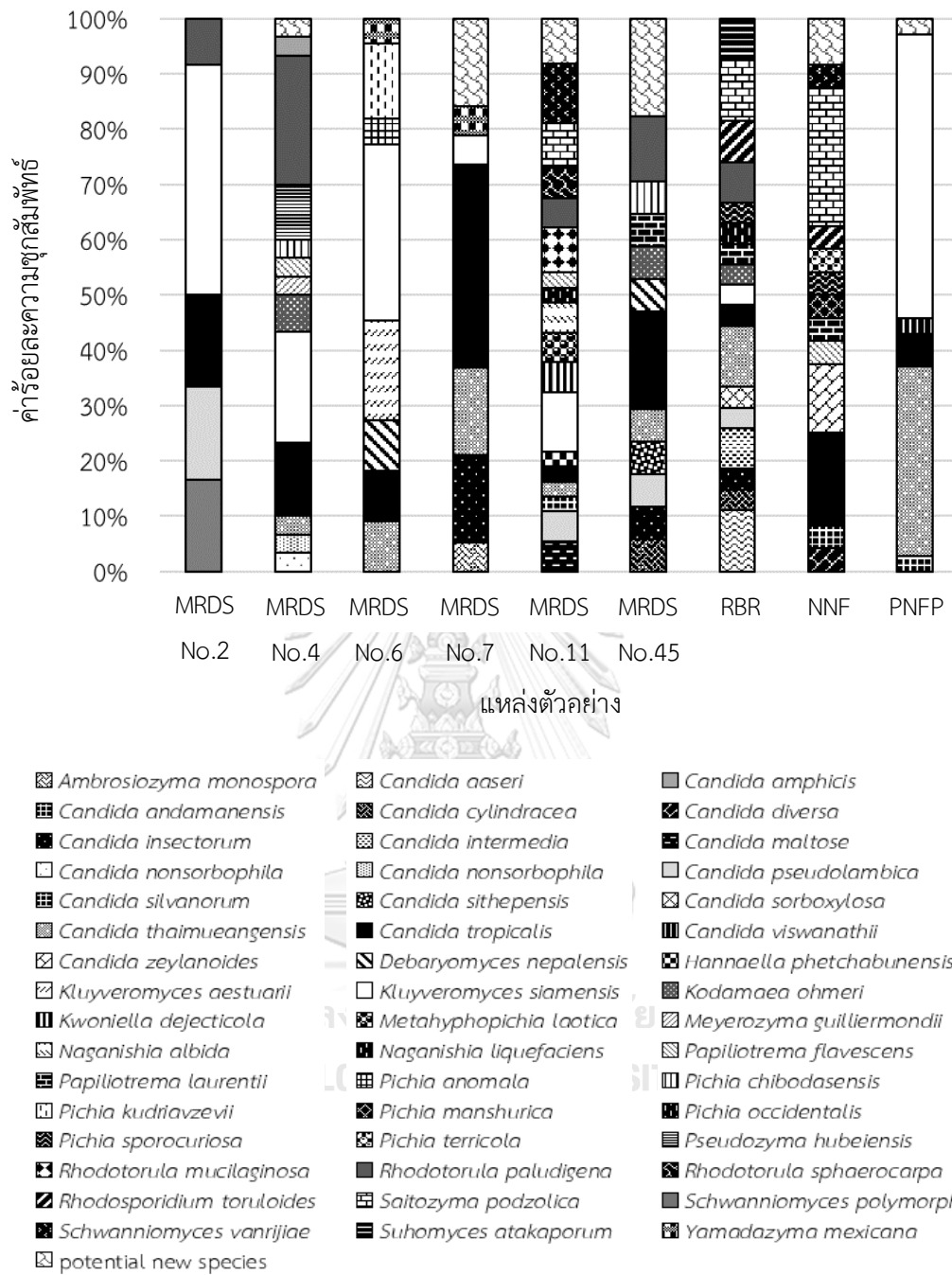
ยีสต์จำนวน 35 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สามารถจำแนกชนิดได้เป็นยีสต์ทราบชนิด จำนวน 2 จีส 5 สปอร์ ได้แก่ *Candida andamanensis*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *C. viswanathii*, *Kluyveromyces siamensis* และยีสต์ที่คาดว่าเป็นยีสต์สปอร์ใหม่ คือ *Prototheca aff. wickerhamii* ยีสต์ทราบชนิดที่พบมากที่สุด คือ *K. siamensis* คิดเป็น 51.43% ของยีสต์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ (ภาพที่ 4.9 และ ตารางที่ ค.9)



- | | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| ▣ <i>C. andamanensis</i> | ▨ <i>C. thaimueangensis</i> |
| ■ <i>C. tropicalis</i> | ▤ <i>C. viswanathii</i> |
| ■ <i>K. siamensis</i> | ▩ <i>Prototheca aff. wickerhamii</i> |

ภาพที่ 4.9 แผนภูมิแสดงจำนวนจีโนมและสปีชีส์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากสวนอุทยานปราณบุรีจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

สรุปผลการจำแนกชนิดยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติทั้ง 9 แห่ง พบว่ายีสต์ทั้งหมด 223 ไอโซเลตจำแนกเป็นยีสต์ทราบชนิดจำนวนทั้งหมด 18 จีโนม 48 สปีชีส์ และยีสต์สปีชีส์ใหม่จำนวน 10 สปีชีส์ แหล่งตัวอย่างที่มีความหลากหลายของยีสต์มากที่สุด คือ สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง (10 จีโนม 17 สปีชีส์ และยีสต์สปีชีส์ใหม่ 2 สปีชีส์) รองลงมา คือ พื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง (9 จีโนม 17 สปีชีส์) (ภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.10 ค่าร้อยละความชุกสัมพัทธ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลนแต่ละแหล่ง (MRDS No. 2, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2; MRDS No. 4, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4; MRDS No. 6, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6; MRDS No. 7, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7; MRDS No. 11, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11; MRDS No. 45, สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45; RBR, พื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง; NNF, อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว; PNFP, วนอุทยานปราณบุรี)

ชนิดของยีสต์ที่พบมากที่สุด คือ *Kluyveromyces siamensis* คิดเป็น 18.83% ของยีสต์ทั้งหมดที่ คัดแยกได้ รองลงมา คือ *Candida tropicalis* (11.7%), *C. thaimueangensis* (10.31%), *Rhodotorula paludigena* (6.28%) และ *Saitozyma podzolica* (5.38%) ตามลำดับ ในขณะที่ชนิดอื่น ๆ พบเพียง 1-6 ไอโซเลต หรือคิดเป็น 0.44 – 2.69% จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ *K. siamensis* ในตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติทั้ง 9 แห่ง พบว่า *K. siamensis* ถูกคัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติทุกแห่งยกเว้นตัวอย่างของอุทกยาศแห่งชาติน้ำตกหงาว และพบมากที่สุดในตัวอย่างดินและน้ำจากป่าชายเลนของวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 18 สายพันธุ์ รองลงมาคือ ตัวอย่างของสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 7 สายพันธุ์ และตัวอย่างของสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด จำนวน 6 สายพันธุ์ *K. siamensis* เป็นสปีชีส์ใกล้เคียง (sister species) กับ *K. aestuarii* และ *K. nonfermentans* ซึ่งถูกคัดแยกได้บ่อยจากตัวอย่างของระบบนิเวศทางทะเลและป่าชายเลน (Araujo และคณะ, 1995) *K. siamensis* ถูกคัดแยกได้ครั้งแรกจากตัวอย่างน้ำในพื้นที่ป่าชายเลนของอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง ประเทศไทย (Am-In และคณะ, 2008) จากนั้นมีรายงานการคัดแยกได้จากตัวอย่างพืชป่าชายเลน เช่น กิ่ง เปลือกไม้ ผล ดอก และราก ที่พบในพื้นที่ชายฝั่งเขตร้อนทางตอนใต้ของประเทศจีน (Chi และคณะ, 2012) รวมทั้งยังมีรายงานการถูกคัดแยกจากตัวอย่างของน้ำในป่าชายเลน จังหวัดระนอง (Kunthiphun และคณะ, 2018) จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเจริญ และการแพร่กระจายของ *K. siamensis* มีความสัมพันธ์กับป่าชายเลนซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของยีสต์สายพันธุ์นี้

Candida tropicalis เป็นยีสต์ที่พบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะพื้นที่บริเวณใกล้เส้นศูนย์สูตร ทั้งในเขตร้อน และเขตกึ่งร้อน มีรายงานการพบในตัวอย่างธรรมชาติหลายชนิด เช่น พืช ผลไม้ ดอกไม้ ดิน น้ำ และ ผลิตภัณฑ์อาหาร (Kvasnikov และคณะ, 1975; Lachance และคณะ, 2011) รวมถึงยังพบได้ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทางการแพทย์ เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สามารถก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Moore และ Strom, 2003; Wang และคณะ, 2007) ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า *C. tropicalis* เป็นหนึ่งในสปีชีส์ของยีสต์ที่ถูกพบได้มากที่สุดและพบบ่อยครั้งในการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลน (Araujo และคณะ, 1995; Chi และคณะ, 2012; Hagler และคณะ, 2017) อาจเนื่องด้วยอุณหภูมิและค่าความเค็มในบริเวณพื้นที่ป่าชายเลนเหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์สปีชีส์นี้ (Chi และคณะ, 2012; Hagler และคณะ, 2017) ในขณะเดียวกันยังมีรายงานว่ายีสต์ *C. tropicalis* จัดอยู่ในกลุ่มยีสต์ที่มีความสัมพันธ์กับมนุษย์ (human-associated yeasts) เช่นเดียวกับ *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Pichia kudriavzevii* และแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม ซึ่งจะพบได้มากในบริเวณป่าชายเลนที่ใกล้กับเขตชุมชน ด้วยเหตุนี้ *C. tropicalis* จึงถือเป็นสปีชีส์ที่บ่งชี้ถึงระดับการถูกรบกวนจากกิจกรรมของมนุษย์และมลภาวะในพื้นที่ป่าชายเลน (Hagler และคณะ

, 2017) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *C. tropicalis* เป็นยีสต์เพียงสปีชีส์เดียวที่ถูกคัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติทั้ง 9 แห่ง โดยพบมากที่สุดในตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 7 สายพันธุ์

Candida thaimueangensis ถูกพบครั้งแรกโดยการคัดแยกจากตัวอย่างน้ำกร่อยในพื้นที่ป่าชายเลนอุทยานแห่งชาติเขาลำปี หาดท้ายเหมือง จังหวัดพังงา ประเทศไทย (Limtong และคณะ, 2007) และมีรายงานการคัดแยกได้จากป่าชายเลนในพื้นที่อุทยานแห่งชาติเอเวอร์เกลดส์ (Everglades National Park) รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา (Fell และคณะ, 2011) ป่าชายเลนในพื้นที่ชายฝั่งเขตร้อนทางตอนใต้ของประเทศจีน (Chi และคณะ, 2012) ป่าชายเลนในพื้นที่จังหวัดระนอง (Kunthiphun และคณะ, 2018) แม้ว่าจะมีรายงานการพบยีสต์สปีชีส์อื่นในแหล่งอื่น เช่น มะกอกเขียวของโรงงานทำมะกอกดองในประเทศสเปน แต่การพบในพื้นที่ป่าชายเลนก็มีความชุกมากกว่าจึงแสดงให้เห็นว่าแหล่งที่อยู่อาศัยของ *C. thaimueangensis* น่าจะมีความสัมพันธ์กับป่าชายเลน ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *C. thaimueangensis* พบมากที่สุดในตัวอย่างจากวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 12 สายพันธุ์

Rhodotorula paludigena เป็นยีสต์จีโนส *Rhodotorula* ที่ถูกคัดแยกได้มากที่สุดในงานวิจัยนี้ ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า *Rh. paludigena* ถูกพบได้บ่อยในตัวอย่างของระบบนิเวศทางทะเล (Kurtzman และคณะ, 2011) และ น้ำหวานของพืช (Canto และคณะ, 2017) การศึกษาครั้งนี้พบว่าโดยมาก *Rh. paludigena* ถูกคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำจาก 5 แหล่งธรรมชาติ ได้แก่ สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 และพื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง และพบบางส่วนคัดแยกได้จากตัวอย่างดินจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังพบยีสต์สปีชีส์อื่น ๆ ในจีโนส *Rhodotorula* (หรือเรียกว่าจีโนส *Rhodospiridium* สำหรับสปีชีส์ที่พบมีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ) ได้แก่ *Rh. mucilaginosa*, *Rh. sphaerocarpa* และ *R. toruloides* Lyman และคณะ (2019) รายงานว่ายีสต์หลายสายพันธุ์ในจีโนสเหล่านี้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพได้หลายชนิด เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพ แครโรทีนอยด์ เอนไซม์ และสารลดแรงตึงผิว จึงจัดได้ว่าเป็นจีโนสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ

Saitozyma podzolica โดยมากถูกคัดแยกได้จากตัวอย่างดินของอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว และสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 ในขณะที่บางส่วนคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า *Sait. podzolica* เป็นยีสต์ที่มีที่อยู่อาศัยในดินเนื่องจากถูกคัดแยกได้บ่อยจากตัวอย่างดินหลายชนิด เช่น ดินในเขตพื้นที่ป่าไม้เขตหนาว (Babjeva และ Rheshetova, 1975), ดินพรุ (Golubev, 1991), ดินบริเวณทุ่งหญ้า (spruce forest) (Yurkov และคณะ, 2012a), ดินป่าไม้สปรูซ (Yurkov และคณะ, 2012b) และยังพบ *Sait. podzolica* ถูก

คัดแยกได้จากแหล่งตัวอย่างอื่น ๆ ซึ่งโดยมากเป็นตัวอย่างที่มีปริมาณสารอินทรีย์และความชื้นสูง เช่น ไม้ผุ (Middelhoven, 2006), ซากพืชในป่าชายเลน (Kunthiphun และคณะ, 2018) ใบไม้ร่วงในป่าผลัดใบ (Mašínová และคณะ, 2017) มอส (Kachalkin และคณะ, 2008) และน้ำในทะเลสาบเขตร้อน (Brandão และคณะ, 2017)

Kluyveromyces aestuarii คัดแยกได้ครั้งแรกจากตะกอนดินปากแม่น้ำ บริเวณปากอ่าว Biscayne เมืองไมอามี รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา (Fell, 1961) ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 Araujo และคณะ (1995) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่พบในสัตว์ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มหอยสองฝา และกลุ่มปู ในพื้นที่ป่าชายเลน Coroa Grande บริเวณปากอ่าว Sepetiba เมืองรีโอเดจาเนโร ประเทศบราซิล พบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้นั้นมีความหลากหลายสูงแต่สปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ *K. aestuarii* และเป็นที่น่าสนใจว่ายีสต์สปีชีส์นี้จะพบเฉพาะในตัวอย่างสัตว์ที่กินซากพืชซากสัตว์ที่ตายแล้วเป็นอาหาร ได้แก่ ปูแสม ปูก้ามดาบ และเพรียง รวมถึงพบในตะกอนที่มีเศษซากพืชที่บดบวมในป่าชายเลน แต่ไม่พบในกลุ่มสัตว์ที่กินสัตว์ที่ยังมีชีวิตเป็นอาหาร ยีสต์สปีชีส์นี้จึงอาจมีบทบาทต่อการย่อยสลายเศษใบไม้ในป่าชายเลน (Hagler และคณะ, 2017) และเป็นอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในป่าชายเลน (Araujo และคณะ, 1995) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบยีสต์ *K. aestuarii* ในตัวอย่างหลายประเภทของระบบนิเวศป่าชายเลน เช่น น้ำบริเวณป่าชายเลนในพื้นที่อุทยานแห่งชาติเอเวอร์เกลดส์ (Everglades National Park) รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา (Fell และคณะ, 2011) ตะกอนดิน ใบไม้ร่วง กิ่งไม้ร่วง และลูกไม้ร่วงในพื้นที่ป่าชายเลนในมณฑลฝูเจี้ยน มณฑลกว่างตุง และมณฑลไห่หนาน ประเทศจีน (Chi และคณะ, 2012) ตัวอย่างดินและน้ำจากพื้นที่ป่าชายเลนในพื้นที่จังหวัดตราด จังหวัดจันทบุรี และจังหวัดระนอง ประเทศไทย (Kunthiphun และคณะ, 2018) ดังนั้น *K. aestuarii* จึงถูกจัดเป็นยีสต์เฉพาะถิ่นของระบบนิเวศป่าชายเลน (Hagler และคณะ, 2017) และเป็นสปีชีส์ของยีสต์ที่บ่งชี้ถึงคุณภาพทางสิ่งแวดล้อมของป่าชายเลน เพราะการพบ *K. aestuarii* ในระบบนิเวศป่าชายเลนและชายฝั่งมีความสัมพันธ์กับมลภาวะและกิจกรรมของมนุษย์ ดังจะเห็นได้จากการศึกษาการกระจายตัวของยีสต์ในพื้นที่ป่าชายเลนที่ตั้งอยู่ใกล้เมืองและมีการปนเปื้อนของมลพิษต่าง ๆ จากชุมชน ในเขตเมืองรีโอเดจาเนโร ประเทศบราซิล ปรากฏว่าไม่พบ *K. aestuarii* ในทุกตัวอย่างแต่พบกลุ่มยีสต์ฉวยโอกาสซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของมนุษย์ เช่น *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. albicans* และ *C. glabrata* (Hagler และคณะ, 1982) การศึกษาการกระจายตัวของ *K. aestuarii* ในพื้นที่ป่าชายเลนจำนวน 8 แห่ง ในเมืองรีโอเดจาเนโร ประเทศบราซิล ป่าชายเลนทุกแห่งพบการกระจายตัวของ *K. aestuarii* ยกเว้นเพียงแห่งเดียว คือ ป่าชายเลนใกล้กับอ่าว Guanabara ซึ่งมีพื้นที่เชื่อมต่อกับชายหาดสาธารณะและมีขยะพลาสติกบนชายหาด (Araujo และ Hagler, 2011) การศึกษาครั้งนี้พบว่าป่าชายเลนในพื้นที่สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 ตำบลบางขุนไทร อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรีเป็นเพียง

แหล่งเดียวที่พบการกระจายตัวของ *K. aestuarii* แม้ว่าป่าชายเลนดังกล่าวนี้จะมีพื้นที่ติดกับแหล่งชุมชน แต่มีคุณภาพสิ่งแวดล้อมที่ดีเพราะได้รับความร่วมมือจากชุมชนโดยรอบในการอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน พื้นที่ป่าชายเลนนี้เป็นแหล่งหอยแครงตามธรรมชาติที่ใหญ่ที่สุดในประเทศไทย ทำเลที่ตั้งอยู่บริเวณปากแม่น้ำที่เชื่อมต่อของแม่น้ำหลายสาย มีความอุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งอาหารและแหล่งอนุบาลสัตว์ทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งหอยแครง (Pumijumnong, 2014)

4.3 ผลการคัดกรองยีสต์อุดมไขมัน

คัดกรองยีสต์อุดมไขมันจากยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ในกลุ่มจีโนสที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเป็นยีสต์ อุดม ไขมัน ได้แก่ *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Saitozyma*, *Papiliotrema*, *Naganishia*, *Kwoniella* และ *Debaryomyces* ที่คัดแยกได้จากข้อ 4.1 จำนวนทั้งหมด 47 สายพันธุ์และยีสต์สปีชีส์ใหม่จำนวน 13 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการย้อมสีหยดน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ที่เจริญบนอาหาร YM สูตรดัดแปลงที่มีปริมาณคาร์บอนสูง แต่มีไนโตรเจนในปริมาณที่จำกัด ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเป็นภาวะที่ส่งเสริมให้เกิดการสะสมไขมันภายในเซลล์ของยีสต์ (Beopoulos และ Nicaud, 2012) ด้วยสีฟลูออเรสเซนไนล์เรด ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์เปรียบเทียบกับขนาดหยดน้ำมันของยีสต์อุดมไขมันสายพันธุ์ควบคุม *Lipomyces starkeyi* JCM 5995 ผลการศึกษาพบยีสต์จำนวน 16 สายพันธุ์ที่มีขนาดของหยดน้ำมันภายในเซลล์ใหญ่กว่าครึ่งของขนาดเซลล์ (ตารางที่ 4.10)

จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ (oil content) ของยีสต์ 16 สายพันธุ์ที่คัดกรองได้ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน (OPM) ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเท่ากับ 62 เป็นเวลา 6 วัน ผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ พบว่าเป็นยีสต์อุดมไขมัน หรือยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์มากกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เพียง 4 สายพันธุ์ คือ *Papiliotrema laurentii* N-16.2, *Rhodotorula sphaerocarpa* 11-14.4, *Saitozyma podzolica* 11-11.3.1 และ *Sait. podzolica* N-8.4 โดยมีปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ เท่ากับ 23.18%, 27.30%, 24.42% และ 20.30% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้เลือกใช้การผลิตน้ำมันแบบ 2 ขั้นตอน เนื่องจากความต้องการสารอาหารของยีสต์ในขั้นตอนการเจริญ และขั้นตอนการผลิตน้ำมันแตกต่างกัน ในขั้นตอนการเจริญจะทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (enriched medium) ในงานวิจัยนี้ใช้อาหารเหลว YM เพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมาก ที่มีความสมบูรณ์และพร้อมที่จะเข้าสู่ระยะการผลิตและสะสมไขมัน เมื่อถ่ายโอนไปยังอาหารเหลวผลิตน้ำมันซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนจำกัด การผลิตน้ำมันแบบ 2 ขั้นตอนนี้มีข้อดีกว่าการผลิตน้ำมันแบบขั้นตอนเดียวที่ต้องรอให้ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด ก่อนเซลล์จึงจะเข้าสู่ระยะการผลิตและสะสมไขมัน

Pap. laurentii N-16.2 และ *Sait. podzolica* N-8.4 คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จังหวัดระยอง ในขณะที่ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 และ *Sait. podzolica* 11-11.3.1 คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระยอง ยีสต์ 4 สายพันธุ์นี้เป็นยีสต์ในกลุ่มจีสที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเป็นยีสต์อุดมน้ำมัน นอกจากนี้ยังมี *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2 ซึ่งเป็นยีสต์อุดมน้ำมันอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ถูกคัดแยกมาจากตัวอย่างดิน จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จังหวัดระยอง เช่นเดียวกับ *Pap. laurentii* N-16.2 และ *Sait. podzolica* N-8.4 แต่ *Cy. subsufficiens* NG8.2 คัดแยกได้บนอาหาร YM ที่ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 1% สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.3% สารสกัดจากมอลต์ 0.3% เพปโตน 0.5% คลอแรมเฟนิคอล 0.0001% และโซเดียมโพรฟิโอะเนต 0.025% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอชเท่ากับ 5.0 ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รัชชา พระนิมิตร, 2560) งานวิจัยครั้งนี้จะนำยีสต์อุดมน้ำมันทั้ง 5 สายพันธุ์นี้มาศึกษาการผลิตน้ำมันและหาภาวะเหมาะสมที่สุดของการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบอ้อย

ยีสต์หลายสปีชีส์ในจีส *Cryptococcus* ซึ่งภายหลังถูกจำแนกเป็นจีสใหม่ ได้แก่ *Naganisia Cutaneotrichosporon*, *Papiliotrema* และ *Saitozyma* มีรายงานว่า เป็นยีสต์อุดมน้ำมัน *Cu. curvatus* เป็นสายพันธุ์ที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย ให้ผลผลิตน้ำมันสูงและสามารถผลิตน้ำมันได้จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด เช่น กลีเซอรอลดิบ (Meesters และคณะ, 1996; Liang และคณะ, 2010) ไฮโดรไลเสตฟางข้าวสาลี (Yu และคณะ, 2011) ไฮโดรไลเสตขานข้าวฟ่างหวาน (Liang และคณะ, 2012) และ ไฮโดรไลเสตน้ำทิ้งของโรงอาหาร (Chi และคณะ, 2011) ในขณะที่ *Pap. laurentii* และ *Sait. podzolica* ยังมีรายงานการศึกษาการผลิตน้ำมันไม่มากนัก *Pap. laurentii* ถูกรายงานครั้งแรกว่าสามารถผลิตน้ำมันได้ 23.81% และ 21.59 (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ในอาหารจำกัดปริมาณไนโตรเจน ที่มีแป้ง 30 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก เสริมด้วยน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม/ลิตร และ น้ำตาลมอลโตส 1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (Guerzoni และคณะ, 1985) และมีรายงานการผลิตน้ำมันของ *Pap. laurentii* สายพันธุ์ AM113 ในไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยอินูลินซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลฟรุคโตส โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ว่ามีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงถึง 54.6% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) (Wang และคณะ, 2018a) *Sait. podzolica* CPOH4 ซึ่งคัดแยกได้จากดินพรุ ประเทศเยอรมัน ถูกรายงานว่าเป็นยีสต์อุดมน้ำมันครั้งแรก โดยมีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ 31.8% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสเท่ากับ 50 กรัม/ลิตร และมีปริมาณไนโตรเจนต่ำ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร (Schulze และคณะ, 2014) และมีรายงานว่า การคัดกรองยีสต์กว่า 500 สายพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้ในคลังจุลินทรีย์ของ Japan Collection of Microorganisms ประเทศญี่ปุ่น พบ *Sait. podzolica*

จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ JCM24504, JCM24505, JCM24508 และ JCM25410 ผลิตน้ำมันได้สูงกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) (Tanimura และคณะ, 2014)

ในขณะเดียวกันยีสต์หลายสายพันธุ์ในจีนัส *Rhodotorula* และ *Rhodospiridium* ถูกจัดเป็นยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตน้ำมัน โดยเฉพาะสปีชีส์ *Rh. glutinis* และ *R. toruloides* ซึ่งมีรายงานการผลิตและสะสมน้ำมันได้สูงถึง 70% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) (Zhao และคณะ, 2008; Beopoulos และคณะ, 2009) ทั้ง 2 สปีชีส์นี้จึงถูกใช้เป็นโมเดลในการศึกษาการผลิตน้ำมัน รวมถึงการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำมันและกรดไขมันบางชนิด (Shi และ Zhao, 2017; Chaturvedi และคณะ, 2019; Tsai และคณะ, 2019) ในขณะที่ *Rh. sphaerocarpa* (เดิม *R. sphaerocarpum*) ยังมีการศึกษาไม่มากนัก มีเพียงบางสายพันธุ์ที่ถูกรายงานว่าเป็นยีสต์อุดมน้ำมัน *Rh. sphaerocarpa* UCDFST 68-43 เป็นสายพันธุ์แรกที่มีรายงานว่าเป็นยีสต์อุดมน้ำมัน โดยมีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงที่สุด 36.60% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเจริญในอาหารจำกัดปริมาณไนโตรเจน ที่มีน้ำตาลกลูโคส 120 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (Sitepu และคณะ, 2013) ต่อมาในปี ค.ศ. 2018 พบ *Rh. sphaerocarpa* 2 สายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นยีสต์อุดมน้ำมัน คือ *Rh. sphaerocarpa* YWW6-1 และ *Rh. sphaerocarpa* SFL14-1SF ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำในพื้นที่ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี และตัวอย่างดินป่าชายเลน จังหวัดระนอง ตามลำดับ โดยมีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ 23.61% และ 26.72% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ) (Kunthiphun และคณะ, 2018)

ตารางที่ 4.10 ผลการย้อมสีไนล์เรดเพื่อดูขนาดหยดน้ำมันในเซลล์ยีสต์

จีนัสและสปีชีส์ของยีสต์	สายพันธุ์ (strain)	ผลการติดสีไนล์เรด
<i>D. nepalensis</i>	NSB6-1, NSB7-1	s
<i>Kw. dejecticola</i>	R11-12.2, R11-15.7.1	+
<i>Nag. albida</i>	R11-1W.1, R11-1w.3	-
<i>Nag. liquefaciens</i>	R11-2W.7	+
<i>Pap. laurentii</i>	MTT4.1, N-16.2	s
	1-3w.1	+
<i>Pap. flavescens</i>	BW1.2, 11-10W.3, N-14.1	+
<i>Rh. mucilaginoso</i>	R11-1W.1.1, R11-1w.5, R11-2W.1	-

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

จีโนมและสปีชีส์ของยีสต์	สายพันธุ์ (strain)	ผลการติด สีไนล์เรด
<i>Rh. paludigena</i>	WW1.2, BW1.3, BW7.3, BW8.1, R11-14.7, MTW11.1	s
	BW7.1, BW7.5, BW8.5, BW9.1, R 11-2w.2, MTW9.2, R1-4W.1, R1-4W.4	+
<i>Rh. sphaerocarpa</i>	11-14.4	s
	11-14.5	+
<i>R. toruloides</i>	1-1.2, 1-1.3, N-1.3	+
<i>Sait. podzolica</i>	R11-11.3.1, N-8.4, N-13.2, N-16.1	s
	R11-15.5.1, R11-15.6, R1-5W.5.1, R1-5W.3, R1-5W.4, N-15.3, N-16.1.2, N-2W.7.2	+
<i>Candida</i> aff. <i>californica</i>	BW6.1	+/-
<i>Candida</i> aff. <i>ecuadorensis</i>	NSK10-1	+/-
<i>Candida</i> aff. <i>quercuum</i>	NSK9-2, NSK13-2	+/-
<i>Candida</i> aff. <i>Silvanorum</i>	R11-14.2, R11-15.8	+/-
<i>Goffeauzyma</i> aff. <i>Gilvescens</i>	R11-8.2	+/-
<i>Sakaguchia</i> aff. <i>Lamellibrachiae</i>	MTW10.1	+
<i>Candida</i> aff. <i>californica</i>	MTT3.2, MTW10.3	+/-
<i>Colacogloea</i> aff. <i>terpenoidalis</i>	N1.4	+/-
<i>Rhodosporidium</i> aff. <i>paludigenum</i>	N7.1	+/-
<i>Prototheca</i> aff. <i>wickerhamii</i>	NSP10-2	s
สายพันธุ์ควบคุม: <i>Lipomyces starkeyi</i> JCM 5995		s

- หมายเหตุ: - คือ ไม่พบหยดน้ำมัน,
 +/- คือ ขนาดหยดน้ำมันขนาดเล็กกว่า 10% ของขนาดเซลล์
 + คือ ขนาดหยดน้ำมันใหญ่กว่า 10% แต่เล็กกว่าครึ่งของขนาดเซลล์
 s คือ ขนาดหยดน้ำมันใหญ่กว่าครึ่งของขนาดเซลล์

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันสะสมภายในเซลล์

ยีสต์	ปริมาณน้ำมันสะสมภายในเซลล์ (%, น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง)
<i>D. nepalensis</i> NSB6-1	6.03
<i>D. nepalensis</i> NSB7-1	5.21
<i>Pap. laurentii</i> MTT4.1	10.04
<i>Pap. laurentii</i> N-16.2	23.18
<i>Rh. paludigena</i> VW1.2	11.03
<i>Rh. paludigena</i> BW1.3	11.23
<i>Rh. paludigena</i> BW7.3	8.00
<i>Rh. paludigena</i> BW8.1	9.16
<i>Rh. paludigena</i> 11-14.7	8.67
<i>Rh. paludigena</i> MTW11.1	11.67
<i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4	27.30
<i>Sait. podzolica</i> 11-11.3.1	24.41
<i>Sait. podzolica</i> N-13.2	13.30
<i>Sait. podzolica</i> N-8.4	20.30
<i>Sait. podzolica</i> N-16.1	11.15
<i>Prototheca</i> aff. <i>wickerhamii</i> NSP10-2	2.42
สายพันธุ์ควบคุม: <i>L. starkeyi</i> JCM 5995	35.15

4.4 ผลการคัดเลือกยีสต์อุตมน้ำมันที่สามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักของไฮโดรไลเสตจากลิกโนเซลลูโลสเพื่อการเจริญได้

ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญของยีสต์อุตมน้ำมัน 4 สายพันธุ์ คือ *Pap. laurentii* N-16.2, *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4, *Sait. podzolica* 11-11.3.1 และ *Sait. podzolica* N-8.4 ที่คัดกรองได้จากข้อ 4.3 ในน้ำตาล 5 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกาแล็กโทส น้ำตาลอะราบินอสและน้ำตาลเซลโลไบโอส ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเป็นน้ำตาลที่พบได้ในไฮโดรไลเสตของลิกโนเซลลูโลส โดยทั่วไป (Tsigie และคณะ, 2011; Xavier และคณะ, 2017) พบว่ายีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลทั้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการเจริญในน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลอะราบินอส ของยีสต์ทั้ง 3 สปีชีส์ที่รายงานในหนังสือ The Yeasts, Fifth Edition: A Taxonomic Study (Kurtzman และคณะ, 2011)

4.5 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์อุตมน้ำมันที่คัดกรองได้

ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์อุตมน้ำมัน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pap. laurentii* N-16.2, *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4, *Sait. podzolica* 11-11.3.1 และ *Sait. podzolica* N-8.4 พบว่าใกล้เคียงกับลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์แต่ละสปีชีส์ที่มีรายงานในหนังสือ The Yeasts, Fifth Edition: A Taxonomic Study (Kurtzman และคณะ, 2011) รายละเอียดของลักษณะสัณฐานวิทยาที่ศึกษามีดังนี้

4.5.1 *Papiliotrema laurentii* N-16.2

ผลการศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเหลว yeast nitrogen base (YNBG) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน พบว่ายีสต์เจริญที่ส่วนบนของอาหารเป็นวงรอบติดที่ขอบหลอดแก้วและตกตะกอนที่ก้นหลอด โคลินีของ *Pap. laurentii* N-16.2 อายุ 7 วัน ที่เจริญบนอาหารแข็ง malt extract agar เข้มข้น 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (5% MEA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สีครีมอ่อน โคลินีนูน ลักษณะคล้ายเมือก ผิวหน้าเรียบมัน ขอบเรียบ ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาด 2.5-5 x 3-6 ไมโครเมตร แตกหน่อที่ด้านหนึ่งของเซลล์ (ภาพที่ 4.11ก) ไม่สร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง yeast morphology agar (YMA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (ภาพที่ 4.12ก) ผลการดูขนาดหยดน้ำมันภายในเซลล์เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง YM สูตรดัดแปลงที่ลดปริมาณไนโตรเจนลง 20 เท่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น

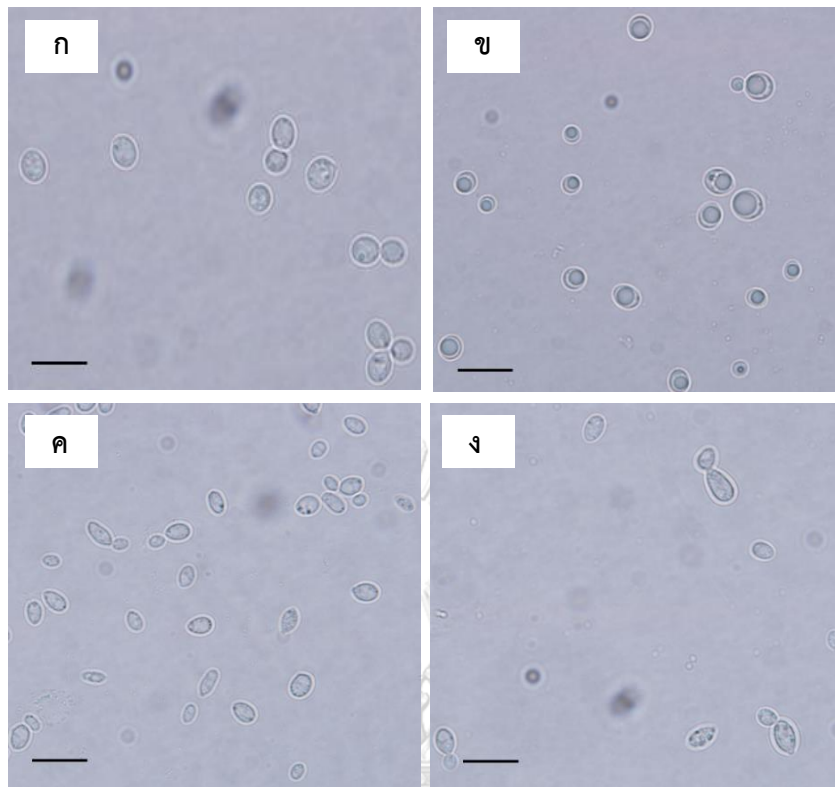
เวลา 7 วัน ย้อมด้วยสีไนล์เรด พบหยดน้ำมันขนาดใหญ่จำนวน 1 หยดและหยดน้ำมันขนาดเล็กอีกจำนวน 1-2 หยด (ภาพที่ 4.13ก)

4.5.2 *Rhodotorula sphaerocarpa* 11-14.4

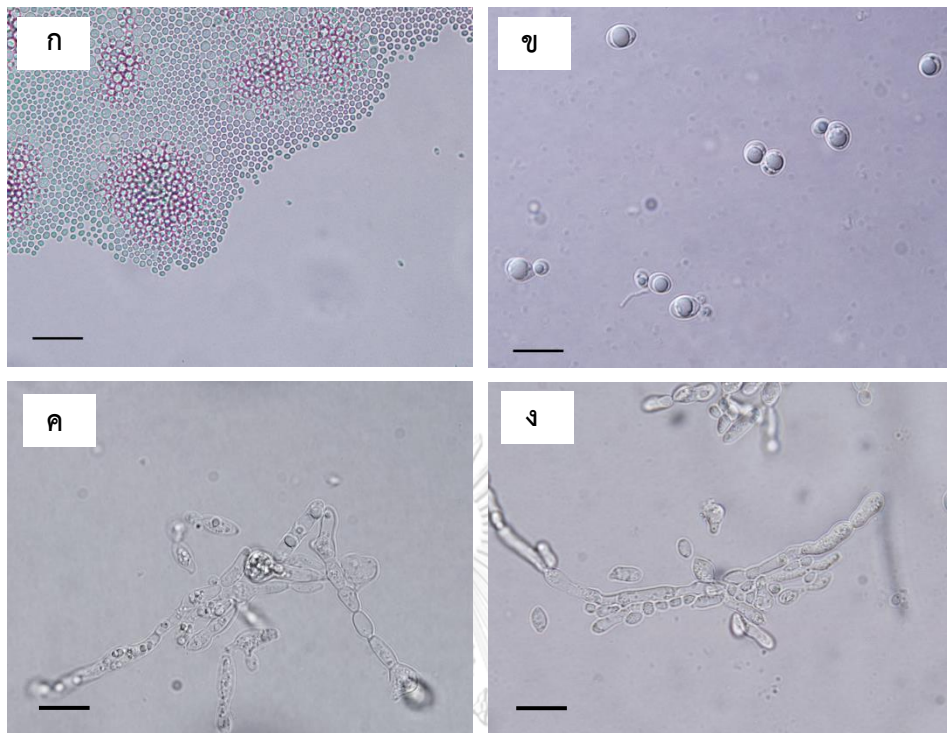
ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ที่เจริญบนอาหารแข็ง malt extract เข้มข้น 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (5% MEA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม สีชมพูอมส้มจนถึงชมพูเข้ม ลักษณะคล้ายเมือก ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบ เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างค่อนข้างกลมและรูปร่างคล้ายไข่ ขนาด 2-5 x 3-6.5 ไมโครเมตร แยกหน่อที่ด้านหนึ่งของเซลล์ (ภาพที่ 4.11ข) ไม่สร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง corn meal ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แต่สร้าง short primary hyphae แบบมีผนังกั้น (septa) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.12ข) ผลการย้อมสีไนล์เรด พบหยดน้ำมันขนาดใหญ่จำนวน 1 หยด และที่ตำแหน่งติดกันยังพบหยดน้ำมันขนาดเล็กอีกจำนวน 3-4 หยด เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง YM สูตรดัดแปลงที่ลดปริมาณไนโตรเจนลง 20 เท่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 4.13ข)

4.5.3 *Saitozyma podzolica* 11-11.3.1 และ *Sait. podzolica* N-8.4

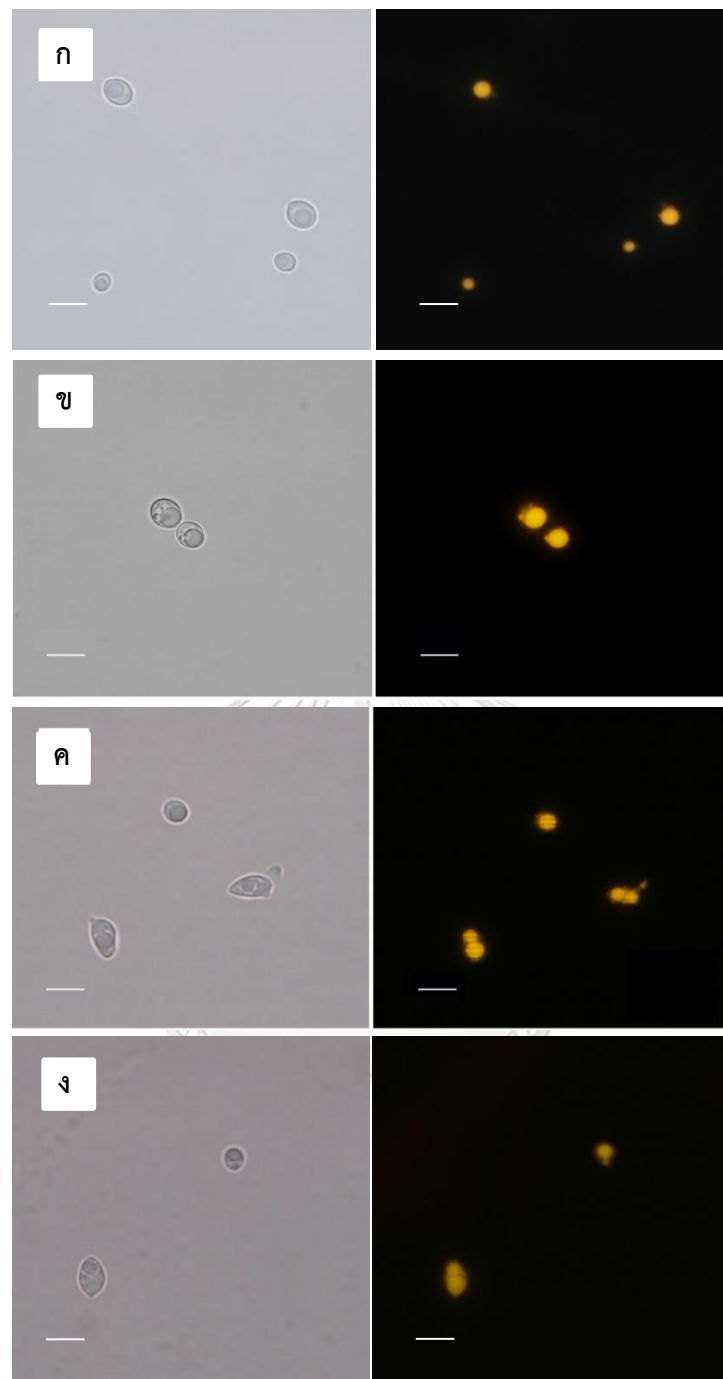
ผลการศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อเจริญในอาหารเหลว yeast nitrogen base (YNBG) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบการเจริญที่ด้านบนของอาหารลักษณะเป็นวงรอบติดที่ขอบหลอดและตกตะกอนเล็กน้อยที่ก้นหลอด เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์รูปร่างรี สายพันธุ์ 11-11-3.1 และ N-8.4 มีขนาด 2-3 x 4-8 ไมโครเมตร และ 2-3.5 x 3-7 ไมโครเมตร ตามลำดับ แยกหน่อที่ขั้วด้านหนึ่งของเซลล์ (ภาพที่ 4.11ค และ ภาพที่ 4.11ง) เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง yeast morphology agar (YMA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โคโลนีมีรูปร่างกลมแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร สีครีมอ่อนไล่ไปจนถึงสีน้ำตาลอ่อน ผิวหน้าเรียบมัน ขอบเป็นคลื่น โค้งเว้าเล็กน้อย ทั้งสองสายพันธุ์สร้างเส้นใยแท้เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง malt extract agar ความเข้มข้น 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (5% MEA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (ภาพที่ 4.12ค และ ภาพที่ 4.12ง) เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง YM สูตรดัดแปลงที่ลดปริมาณไนโตรเจนลง 20 เท่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลการย้อมสีไนล์เรดพบหยดน้ำมันขนาดใหญ่ภายในเซลล์จำนวน 1-2 หยด และในบางเซลล์ยังพบหยดน้ำมันขนาดเล็กจำนวน 1-2 หยด (ภาพที่ 4.13ค และ ภาพที่ 4.13ง)



ภาพที่ 4.11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) ของยีสต์อุดมไขมัน 4 สายพันธุ์ ก) *Pap. laurentii* N-16.2 เจริญบนอาหารแข็ง 5% MEA ข) *Rh. sphaerocarpa* (11-14.4) เจริญบนอาหารแข็ง 5% MEA ค) *Sait. podzolica* 11-11-3.1 เจริญบนอาหารแข็ง YMA ง) *Sait. podzolica* N-8.4 เจริญบนอาหารแข็ง YMA แถบมาตราส่วน (scale bar) เท่ากับ 10 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.12 Dalmau slide culture ของยีสต์อุดมน้ำมัน 4 สายพันธุ์ ก) *Pap. laurentii* N-16.2 เจริญบนอาหาร YMA ข) *Rh. sphaerocarpa* (11-14.4) เจริญบนอาหาร corn meal agar ค) *Sait. podzolica* 11-11-3.1 เจริญบนอาหาร 5% MEA ง) *Sait. podzolica* N-8.4 เจริญบนอาหาร 5% MEA เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า) แถบมาตราส่วนเท่ากับ 10 ไมโครเมตร



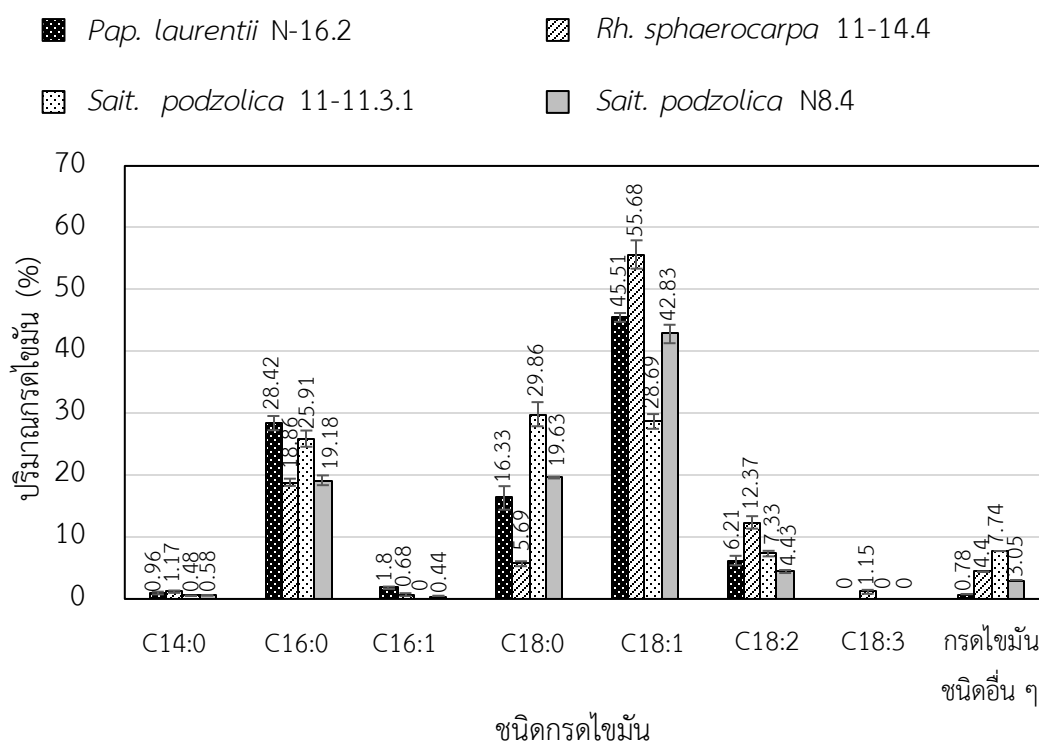
ภาพที่ 4.13 ลักษณะหยดน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์อุดมน้ำมัน 4 สายพันธุ์ ก) *Pap. laurentii* N-16.2 ข) *Rh. sphaerocarpa* (11-14.4) ค) *Sait. podzolica* 11-11-3.1 ง) *Sait. podzolica* N-8.4 เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง YM สูตรดัดแปลงโดยลดปริมาณไนโตรเจนลง 20 เท่า ย้อมด้วยสีไนล์เรด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ซ้าย) และกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ขวา) (กำลังขยาย 1000 เท่า) แถบมาตราส่วนเท่ากับ 10 ไมโครเมตร

4.6 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันของยีสต์อูคุมน้ำมัน

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันของยีสต์อูคุมน้ำมันทั้ง 4 สายพันธุ์เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเท่ากับ 155 เป็นเวลา 6 วัน แสดงดังภาพที่ 4.14 พบว่ากรดไขมันที่พบมากที่สุดในน้ำมันยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 คือ กรดโอเลอิก (C18:1) 55.68% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) รองลงมา คือ กรดปาล์มิติก (C16:0) 25.91% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ซึ่งกรดไขมันทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นกรดไขมันหลักในน้ำมันพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล เช่น น้ำมันเรพซีด น้ำมันปาล์ม เป็นต้น (Hoekman และคณะ, 2012) น้ำมันยีสต์ *Pap. laurentii* N-16.2 และ *Sait. podzolica* N8.4 มีองค์ประกอบกรดไขมันคล้ายคลึงกัน โดยกรดไขมันที่พบมากที่สุด 3 ลำดับแรก คือ กรดโอเลอิก กรดปาล์มิติก และ กรดสเตียริก (C18:0) น้ำมันของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีชนิดและปริมาณกรดไขมันคล้ายกับไขมันสัตว์ (tallow) ซึ่งมีส่วนประกอบกรดไขมันหลักเรียงจากปริมาณมากไปน้อย ดังนี้ กรดโอเลอิก 41.2% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) กรดปาล์มิติก 24.3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) กรดสเตียริก 18.2% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) กรดลิโนเลอิก (C18:2) 4.4% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (Hoekman และคณะ, 2012) ไขมันสัตว์เป็นอีกหนึ่งวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตไบโอดีเซล (da Cunha และคณะ, 2009; Sanford และคณะ, 2009) ดังนั้นน้ำมันยีสต์ *Pap. Laurentii* N-16.2, *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 และ *Sait. podzolica* N8.4 จึงเหมาะที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเป็นไบโอดีเซล

ในขณะที่น้ำมันยีสต์ *Sait. podzolica* 11-11.3.1 มีองค์ประกอบกรดไขมันหลัก 3 ชนิด คือ กรดสเตียริก 29.86% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) กรดโอเลอิก 28.69% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และ กรดปาล์มิติก 25.91% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และเมื่อจำแนกตามประเภทความอิ่มตัวของกรดไขมัน พบปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เท่ากับ 56.25% และ 36.02% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับไขมันที่สกัดได้จากผลโกโก้ หรือที่เรียกกันว่าเนยโกโก้ (cocoa butter) (Zarringhalami และคณะ, 2012) ซึ่งมีส่วนประกอบกรดไขมันอิ่มตัว 57-64% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และ กรดไขมันไม่อิ่มตัว 36-43% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (Naik และ Kumar, 2014) เนยโกโก้เป็นไขมันที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร การแพทย์ และเครื่องสำอาง (Mursu และคณะ, 2004; Heinrich และคณะ, 2006; Wang และ Maleky, 2018) ก่อนหน้านี้มีรายงานว่าน้ำมันของยีสต์อูคุมน้ำมันหลายสายพันธุ์มีองค์ประกอบกรดไขมันคล้ายกับเนยโกโก้ เช่น *Cutaneotrichosporon* (*Cu.*) *curvatus* ATCC 2059 (Hassan และคณะ, 1994) *Cu. oleaginosus* DSM11815 (Wei และคณะ, 2017) *Yarrowia* (*Y.*) *lipolytica* LGAM S(7)1 (Papanikolaou และคณะ, 2001) *Rh. toluroids* Y4 (Wu และคณะ, 2011) แต่ยังไม่มียางานใน *Sait. podzolica* ก่อนหน้านี้มีรายงานว่าน้ำมันของ *Sait. podzolica* CPOH4 มีองค์ประกอบกรดไขมันหลัก 2 ชนิด คือ กรดโอเลอิก (C18:1) 59.4% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และ กรดปาล์มิติก (C16:0)

18.4% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (Schulze และคณะ, 2014) ซึ่งแตกต่างจากองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Sait. podzolica* 11-11.3.1 และของยีสต์สปีชีส์เดียวกันในงานวิจัยนี้ คือ *Sait. podzolica* N8.4 ทั้งนี้เป็นเพราะองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์สปีชีส์เดียวกันอาจต่างกันได้หากองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และ/หรือ ภาวะการเจริญแตกต่างกัน (Sitepu และคณะ, 2013; Sitepu และคณะ, 2014)



CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.14 องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมันที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน เท่ากับ 155 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

ตารางที่ 4.12 องค์ประกอบทางเคมีของใบอ้อย

องค์ประกอบ	ร้อยละของน้ำหนักใบอ้อย
เซลลูโลส	38.8
เฮมิเซลลูโลส	23.5
ลิกนิน	13.8
เถ้า	11.4

ตารางที่ 4.13 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตใบอ้อย

องค์ประกอบ (กรัม/ลิตร)	ชนิดไฮโดรไลเสตใบอ้อย	
	12%-SLH	12%-DSLH
ผลรวมปริมาณน้ำตาล	36.46	34.42
กลูโคส	16.6 ± 0.08	15.43 ± 0.1
ไซโลส	15.87 ± 0.05	14.90 ± 0.00
กาแล็กโตส	0.36	0.36
อะราบิโนส	3.63	3.73
เซลโลไบโอส	nd	nd
สารยับยั้งการเจริญ		
เฟอร์ฟูรัล	0.09	0.07
5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF)	0.30	0.24
ธาตุอาหารรอง		
แมกนีเซียม	0.0025	0.0019
โพแทสเซียม	1.26	1.17
ฟอสฟอรัส	0.0751	0.00065
แมงกานีส	0.0075	0.00062
แคลเซียม	0.362	0.536

ตารางที่ 4.13 (ต่อ)

องค์ประกอบ (กรัม/ลิตร)	ชนิดไฮโดรไลเสตไบออย	
	12%-SLH	12%-DSLH
เหล็ก	0.0013	0.00079
คอปเปอร์	<0.0001	<0.0001
สังกะสี	0.0018	0.00085
ไนโตรเจนทั้งหมด	0.6	0.5
ฟอสเฟส	0.0757	0.000014
อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน	24	28
อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส	194	21,182

หมายเหตุ: nd (not detectable) คือ ตรวจไม่พบ

SLH คือ ไฮโดรไลเสตไบออยที่ไม่ผ่านการปรับต่างเกิน

DSLH คือ ไฮโดรไลเสตไบออยที่ผ่านการปรับต่างเกิน

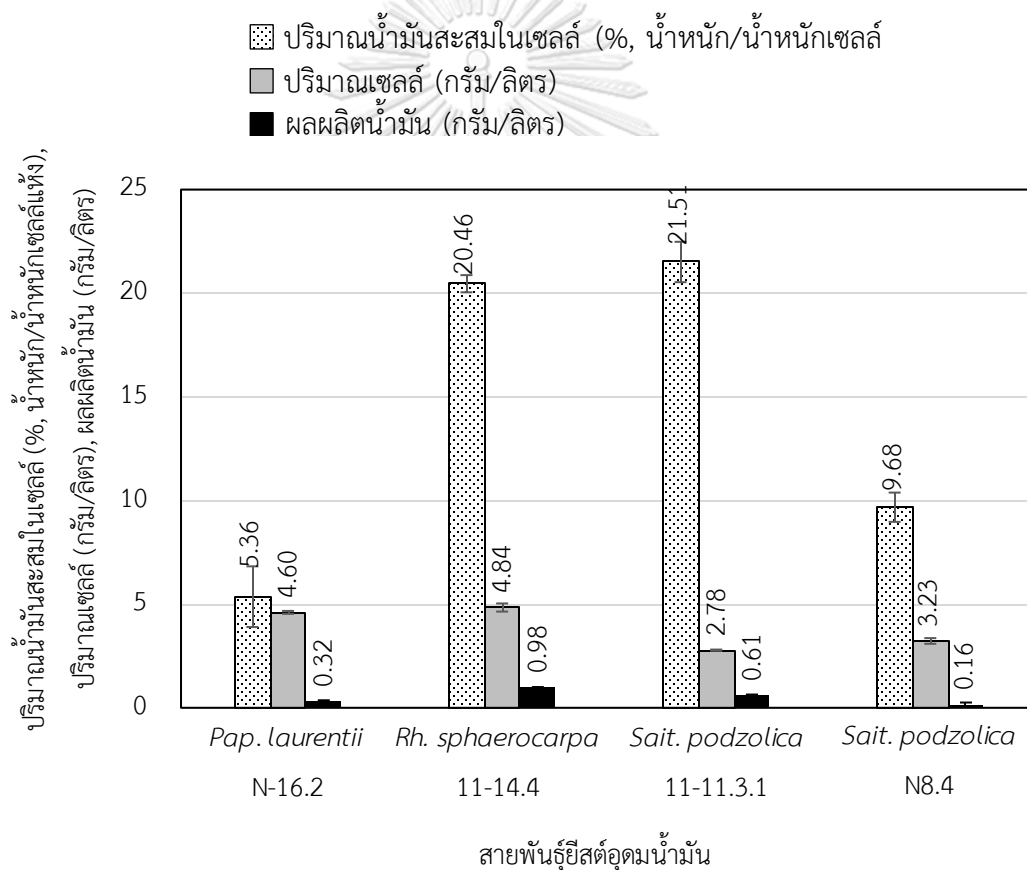
คาร์บอน คือ ผลรวมของน้ำตาลซึ่งยีสต์สามารถใช้เพื่อการเจริญได้

4.8 ผลการคัดเลือกยีสต์อุดมน้ำมันที่สามารถผลิตน้ำมันใน 12%-SLH

ผลการผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมัน 4 สายพันธุ์ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรไลเสตไบออยเพื่อการเจริญ (ผลจากข้อ 4.4) โดยการเพาะเลี้ยงใน 12%-SLH พบว่าผลผลิตน้ำมัน *Sait. podzolica* 11-11.3.1 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ 21.51% รองลงมา คือ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เท่ากับ 20.46% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) (ภาพที่ 4.15) เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ (cell biomass) พบว่า *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีปริมาณเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 4.83 กรัม/ลิตร รองลงมา คือ *Pap. laurentii* N-16.2 เท่ากับ 4.60 กรัม/ลิตร เมื่อคำนวณผลผลิตน้ำมัน (oil yield) พบว่า *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุดเท่ากับ 0.98 กรัม/ลิตร ทั้งนี้การวิจัยนี้ไม่ได้ควบคุมให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นในวันที่ 0 ของการผลิตน้ำมันของยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีค่าเท่ากัน จึงอาจเป็นไปได้ว่า *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เจริญเร็วกว่า *Sait. podzolica* 11-11.3.1 ในอาหาร YM ดังนั้นจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ในวันที่ 0 ของการผลิตน้ำมันจึงสูงกว่าของ *Sait. podzolica* 11-11.3.1

อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณน้ำมันที่สะสมได้ของยีสต์อุดมน้ำมันทั้ง 4 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงใน 12%-SLH ต่ำกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน (OPM) (ตารางที่ 4.11) ทั้งนี้เนื่องจากใน

12%-SLH มีปริมาณน้ำตาลต่ำ แต่มีไนโตรเจนสูง จึงมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำกว่าในอาหารเหลว OPM ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์อุดมไขมันได้ อีกทั้งใน 12%-SLH ยังประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส และน้ำตาลกาแลคโตส ขณะที่ในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน OPM มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว ยีสต์อุดมไขมันหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Rhodosporidium paludigenum* DMKU-RE61, *R. toruloides* DMKU-RE16, *R. toruloides* DMKU-RE124, *Rhodotorula taiwanensis* DMKU-CE53, *Rh. taiwanensis* DMKU-RK188 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส อัตราส่วน 2:1 (Poontawe และคณะ (2017))



ภาพที่ 4.15 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมไขมัน 4 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตไบอ้อย

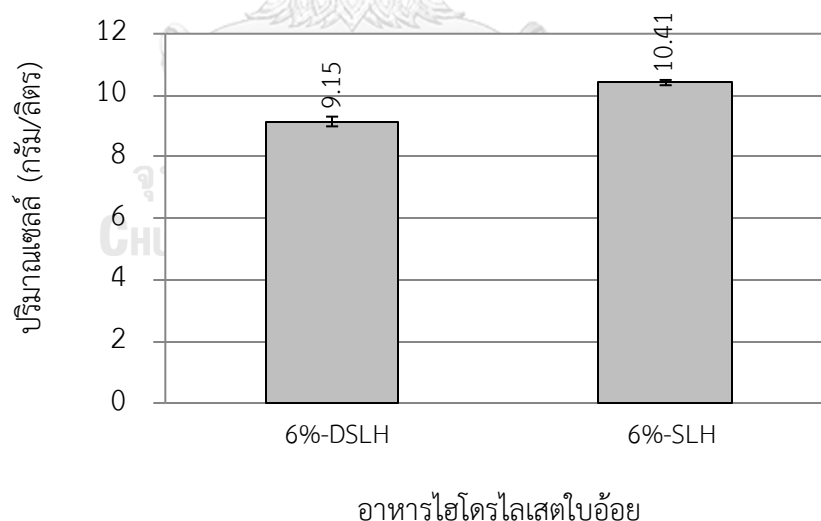
4.9 ผลการหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตน้ำมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตใบอ้อย

ผลการหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ซึ่งคัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้ (ผลจากข้อ 4.7) และของ *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2 ซึ่งมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่ามีกรดพาล์มิโตเลอิก (โอเมกา 7) ปริมาณสูง (รัชนา พระนิมิตร, 2560) เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตใบอ้อย

4.9.1 *Rhodotorula sphaerocarpa* 11-14.4

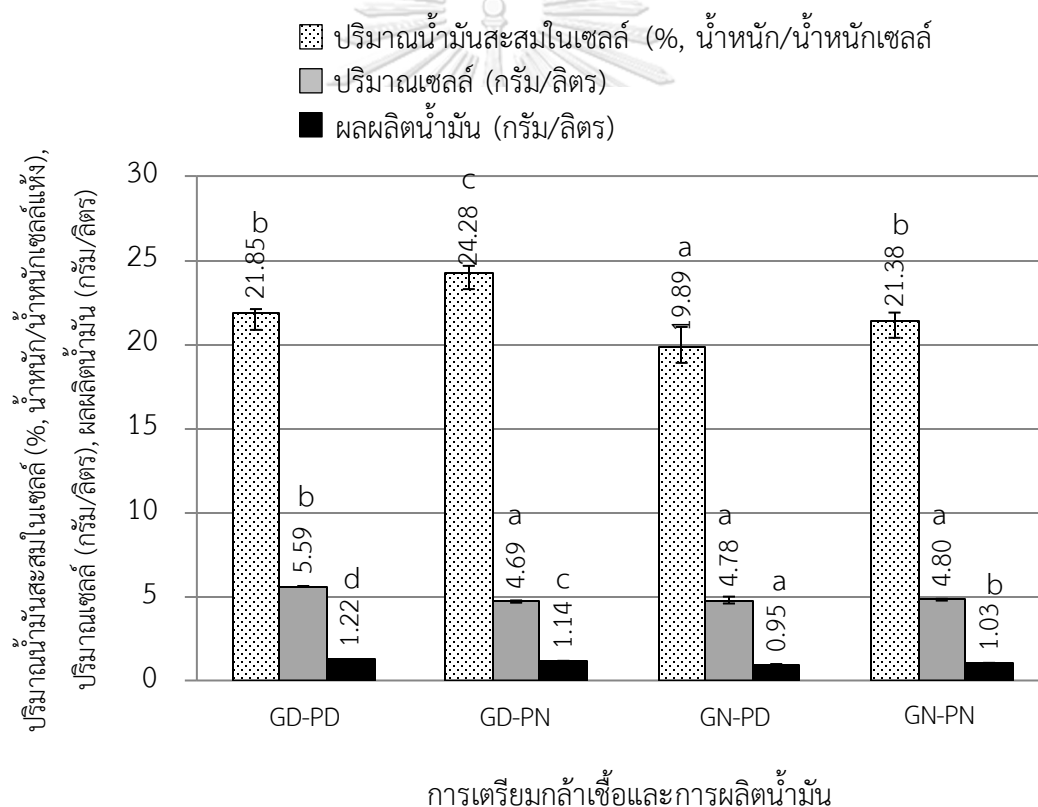
4.9.1.1 ผลการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับต่างเกิน

ผลการเพาะเลี้ยง *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ในอาหารไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ผ่าน (6%-DSLH) และไม่ผ่าน (6%-SLH) การปรับต่างเกิน ที่เติมสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.3% และเพปโทน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่า *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เจริญในอาหาร 6%-SLH ได้ดีกว่าใน 6%-DSLH โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10.41 และ 9.15 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.16) การที่ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เจริญใน 6%-DSLH ได้น้อยกว่าใน 6%-SLH อาจเป็นผลมาจากปริมาณน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณธาตุอาหารรองที่ลดลงใน 6%-DSLH เมื่อเทียบกับ 6%-SLH เนื่องจากการปรับต่างเกิน



ภาพที่ 4.16 การเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อเจริญใน 6%-DSLH และ 6%-SLH

ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ในไฮโดรไลสโตไบออยที่ผ่าน (12%-DSLH) และไม่ผ่าน (12%-SLH) การปรับต่างเกิน เป็นเวลา 4 วัน โดยใช้กล้าเชื้อ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิดต่างกัน คือ 6%-DSLH และ 6%-SLH พบว่า *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงที่สุด 24.28% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อใช้กล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร 6%-DSLH และผลิตน้ำมันใน 12%-SLH (ภาพที่ 4.17) แต่ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุด 1.22 กรัม/ลิตร เมื่อใช้กล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร 6%-SLH และผลิตน้ำมันใน 12%-DSLH ซึ่งได้ผลผลิตน้ำมัน 1.20 กรัม/ลิตร ทั้งนี้เพราะ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีปริมาณเซลล์สูงที่สุด 5.59 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองนี้จึงเลือกใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH แล้วเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันใน 12%-DSLH และ 12%SLH ตามระยะเวลาการบ่มในการทดลองถัดไป



ภาพที่ 4.17 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อผลิตน้ำมันในไฮโดรไลสโตไบออยที่ผ่าน (12%-DSLH, PD) และไม่ผ่านการปรับต่างเกิน (12%-SLH, PN) (GD กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH; GN กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-SLH) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ซึ่งได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

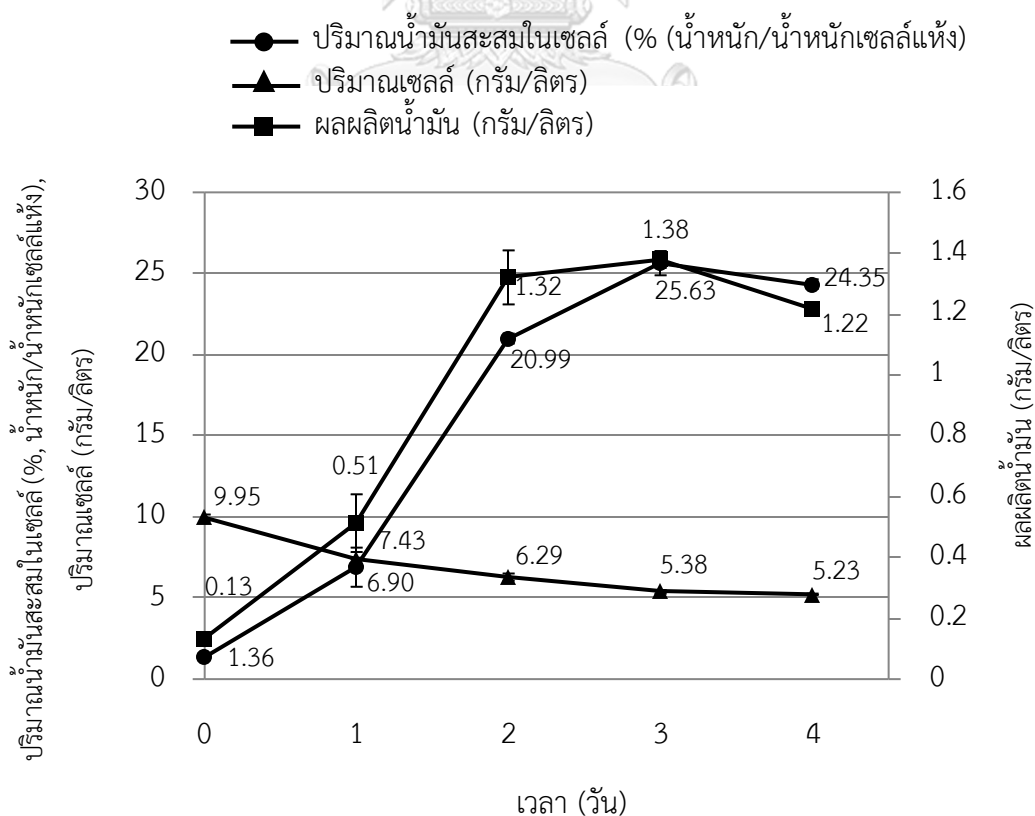
4.9.1.2 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH และ 12%-DSLH เมื่อใช้กล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร 6%-DSLH

ผลการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ในไฮโดรไลเสตไบอ้อย 2 ชนิด คือ 12%-SLH และ 12%-DSLH โดยใช้กล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร 6%-DSLH เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน พบว่า *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ และให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุดเท่ากับ 25.63% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 1.38 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และมีค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิตน้ำมัน (oil yield coefficient) เท่ากับ 99.98 มิลลิกรัม/กรัม น้ำตาลกลูโคส ที่ 3 วัน เมื่อผลิตน้ำมันใน 12%-SLH (ภาพที่ 4.18) ซึ่งสูงกว่าเมื่อผลิตน้ำมันใน 12%-DSLH ซึ่งมีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ผลผลิตน้ำมัน และค่าสัมประสิทธิ์ผลผลิตน้ำมันเพียง 23.22 % (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 1.32 กรัม/ลิตร และ 66.05 มิลลิกรัม/กรัม น้ำตาลกลูโคส ตามลำดับ ที่ 3 วันเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.19) ขณะเดียวกันพบว่า *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ที่เพาะเลี้ยงใน 12%-DSLH มีอัตราการลดลงของปริมาณเซลล์ต่ำกว่า และมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน 12%-SLH (ภาพที่ 4.20) ทั้งนี้ อาจเนื่องจากอิทธิพลของสารยับยั้งการเจริญในไฮโดรไลเสตไบอ้อย จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าสารยับยั้งการเจริญในไฮโดรไลเสตไบอ้อยมีผลยับยั้งการเจริญของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 แต่ไม่มีผลต่อการผลิตน้ำมัน

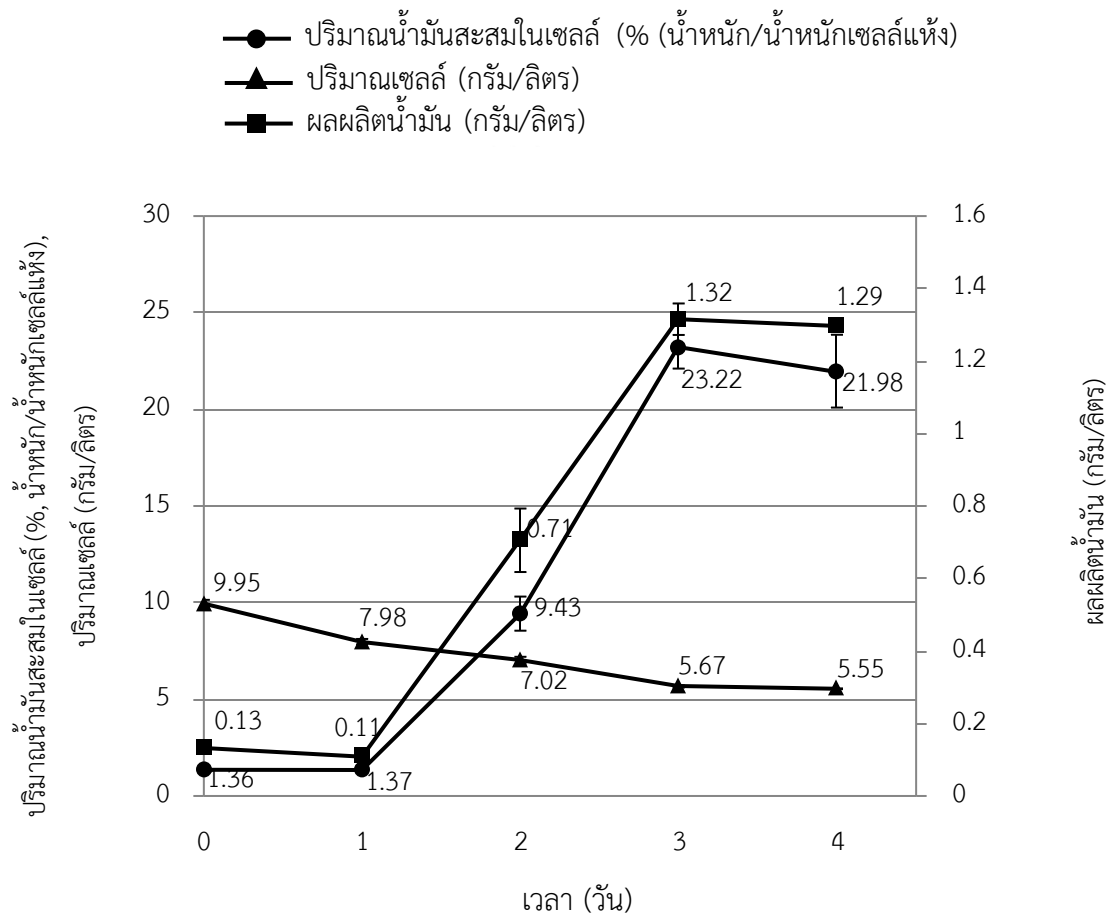
อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้ พบว่าปริมาณเซลล์ที่ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ผลิตได้ทั้งใน 12%-SLH และ 12%-DSLH ลดลงเมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ อาจเนื่องจากเมื่อเพาะเลี้ยง *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ในไฮโดรไลเสตไบอ้อยซึ่งมีไนโตรเจนจำกัด เป็นภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (environmental stress) ที่กระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนกลไกเมแทบอลิซึมจากการสังเคราะห์โปรตีนและสารพันธุกรรม มาเป็นการสร้าง Acetyl-CoA และ NADPH จากคาร์บอนที่มีอยู่มากเกินพอเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นและพลังงาน ตามลำดับ ในกระบวนการสังเคราะห์ไขมันเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสะสมภายในเซลล์ การเจริญจึงหยุดชะงัก (Garay และคณะ, 2014) ขณะเดียวกันสารอาหารที่มียังไม่เพียงพอ เซลล์จึงเกิดการสลายตัวเอง (Autophagy) เพื่อใช้เป็นสารอาหารและแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ Zhu และคณะ (2012) รายงานว่าภายใต้ภาวะจำกัดไนโตรเจน พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวเองของ *Rhodospiridium toruloides* มีการแสดงออกของเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกัน Wang และคณะ (2018b) ก็พบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวเองของ *R. toruloides* เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกันเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะจำกัดฟอสฟอรัส นอกจากนี้ยังรายงานว่ายีนดังกล่าวมีบทบาทในการสลายองค์ประกอบภายในเซลล์เพื่อให้ได้สารเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำมัน และเพื่อให้มีพื้นที่ว่างในเซลล์สำหรับการสะสมน้ำมันอีกด้วย

Poontawee และคณะ (2017) รายงานว่า 5 ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล เข้มข้น 7.0 กรัม/ลิตร ในอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนสูง ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Rh. fluvia* DMKU-SP314 Yu และคณะ (2011) รายงานว่า *Cu. curvatus* สามารถเจริญและผลิตน้ำมันได้สูงในไฮโดรไลเสตฟางข้าวสาลีที่ไม่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญ โดย 5 ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัลเข้มข้น 3 กรัม/ลิตรไม่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมัน ในขณะที่เพอร์ฟูรัล 1 กรัม/ลิตร ทำให้การเจริญและการผลิตน้ำมันลดลง 72% และ 62% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เพอร์ฟูรัล และ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล เข้มข้นต่ำกว่า 1 และ 2 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ไม่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Trichosporon cutaneum* 2.1374 (Chen และคณะ, 2009) *L. starkeyi* มียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมสารยับยั้งการเจริญ ทั้งนี้เพราะพบว่าปริมาณของเพอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัลในไฮโดรไลเสตขานอ้อยที่ไม่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญลดลงหลังการผลิตน้ำมันของ *L. starkeyi* (Xavier และคณะ, 2017)

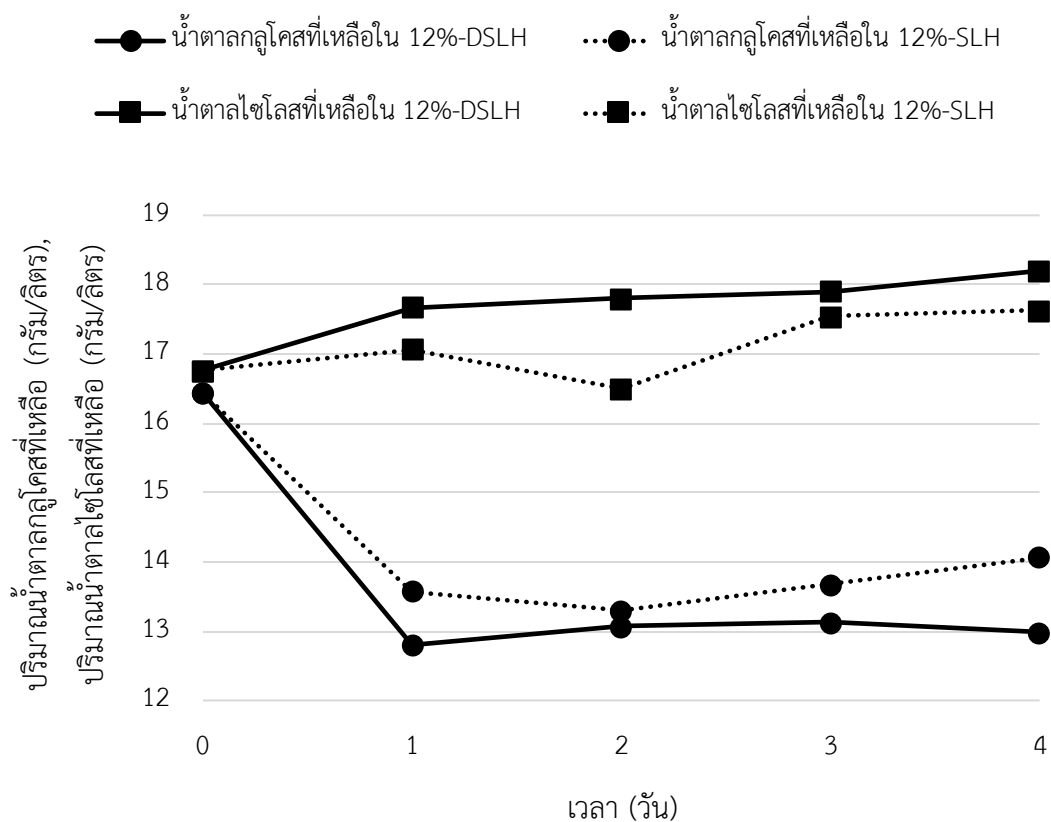
จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ไม่ผ่านการปรับด่างเกิน (12%-SLH) และใช้กล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร 6%-DSLH ในการทดลองถัดไป



ภาพที่ 4.18 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH และผลิตน้ำมันใน 12%-SLH



ภาพที่ 4.19 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH และผลิตน้ำมันใน 12%-DSLH

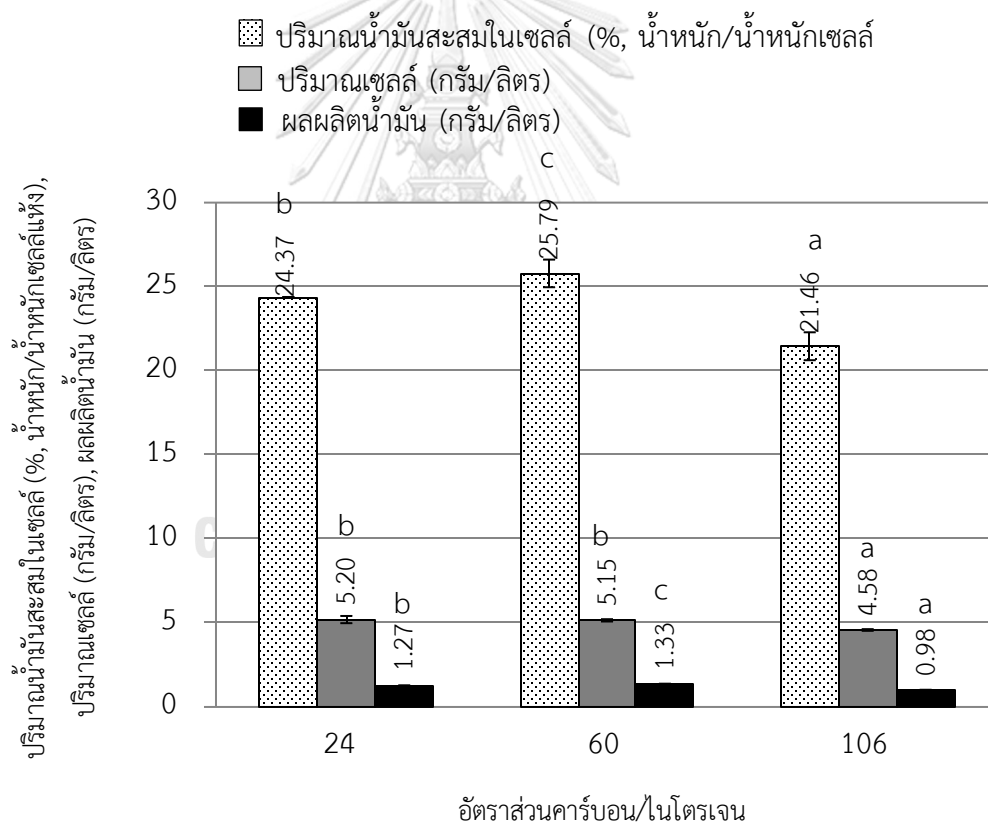


ภาพที่ 4.20 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสที่ละลาย เมื่อเพาะเลี้ยง *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH และ 12%-DSLH โดยใช้กล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร 6%-DSLH

4.9.1.3 ผลของอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH

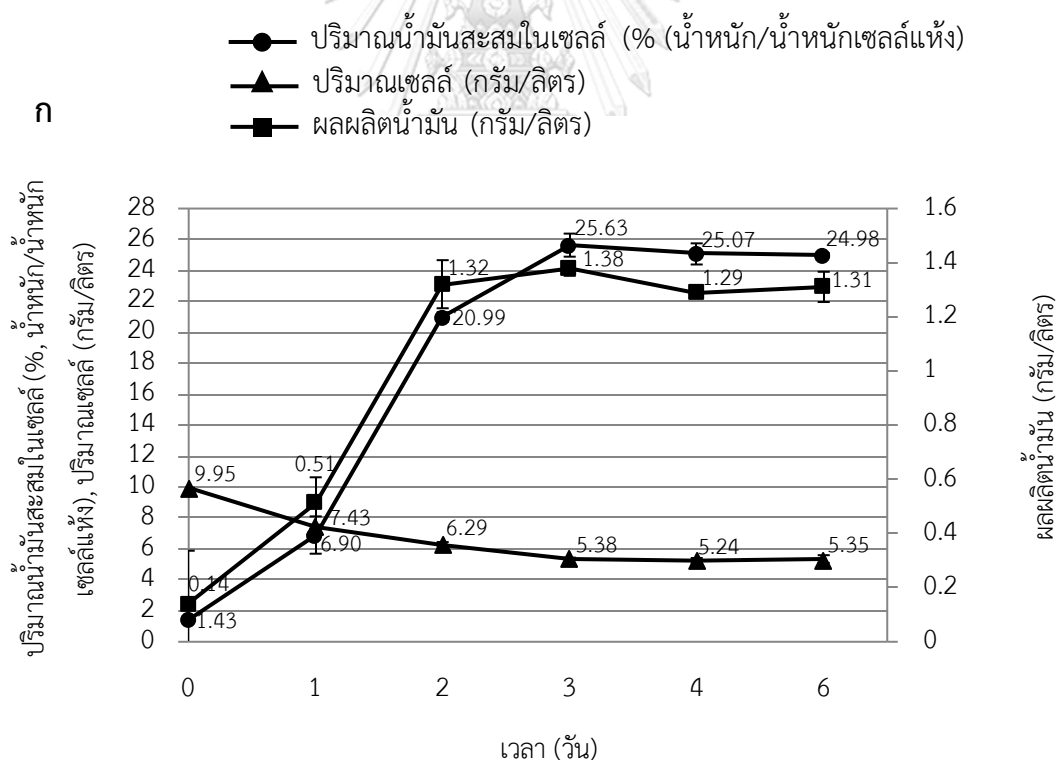
ผลการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่แปรผันอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเริ่มต้นเป็น 24, 60 และ 106 (12%-SLH มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน เท่ากับ 24) ใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH บ่มนาน 4 วัน พบว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนของ 12%-SLH เพิ่มขึ้นจาก 24 เป็น 60 ทำให้ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์และผลผลิตน้ำมันสูงขึ้น จาก 24.37% เป็น 25.79% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ จาก 1.27 เป็น 1.33 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.21) แต่เมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนใน 12%-SLH เพิ่มขึ้นต่อไปเป็น 106 ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์และผลผลิตน้ำมันจะลดลงเป็น 21.46% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 0.98 กรัม/ลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าการผลิตและการสะสมน้ำมันในเซลล์ของยีสต์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วน

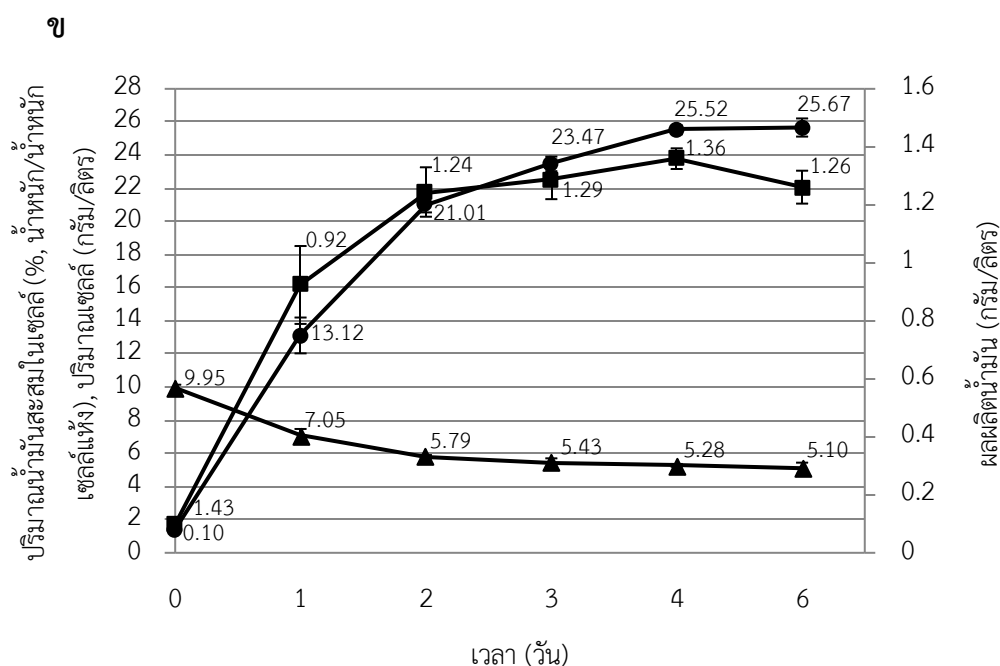
คาร์บอน/ไนโตรเจนของอาหารผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นจนถึงอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วต่อจากนั้นจะลดลง (Sitepu และคณะ, 2014) Chen และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตน้ำมันของ *T. cutaneum* ในไฮโดรไลเสตซังข้าวโพด พบว่าปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ของ *T. cutaneum* เพิ่มขึ้นจาก 40% เป็น 47.1% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนในไฮโดรไลเสตซังข้าวโพดเพิ่มขึ้นจาก 60 เป็น 180 แต่เมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 200 ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์จะลดลง Papanikolaou และ Aggelis (2011) รายงานว่าอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์อุตสาหกรรมต้องมีค่ามากกว่า 20 อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนใน 12%-SLH เพิ่มขึ้นจาก 24 เป็น 60 แม้ว่าปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์สูงสุดจะเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณเซลล์ลดลง ทำให้ผลผลิตน้ำมันเมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเป็น 24 และ 60 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงศึกษาเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันใน 12%-SLH ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเป็น 24 และ 60 ที่ระยะเวลาการบ่มต่าง ๆ ในการทดลองถัดไป



ภาพที่ 4.21 ผลของอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ซึ่งได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

4.9.1.4 ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเป็น 24 และ 60 เมื่อแปรผันระยะเวลาเพาะเลี้ยง ผลการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเท่ากับ 24 *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุด 25.63% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด 1.38 กรัม/ลิตร เมื่อบ่มนาน 3 วัน อัตราการผลิตน้ำมัน (oil productivity) เท่ากับ 0.46 กรัม/ลิตร/วัน ในขณะที่การผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเท่ากับ 60 *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุด 25.52% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด 1.36 กรัม/ลิตร เมื่อบ่มนาน 4 วัน อัตราการผลิตน้ำมัน 0.34 กรัม/ลิตร/วัน (ภาพที่ 4.22) จากผลการทดลองนี้จึงเลือกผลิตน้ำมัน *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่ไม่ปรับอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนในการทดลองถัดไป



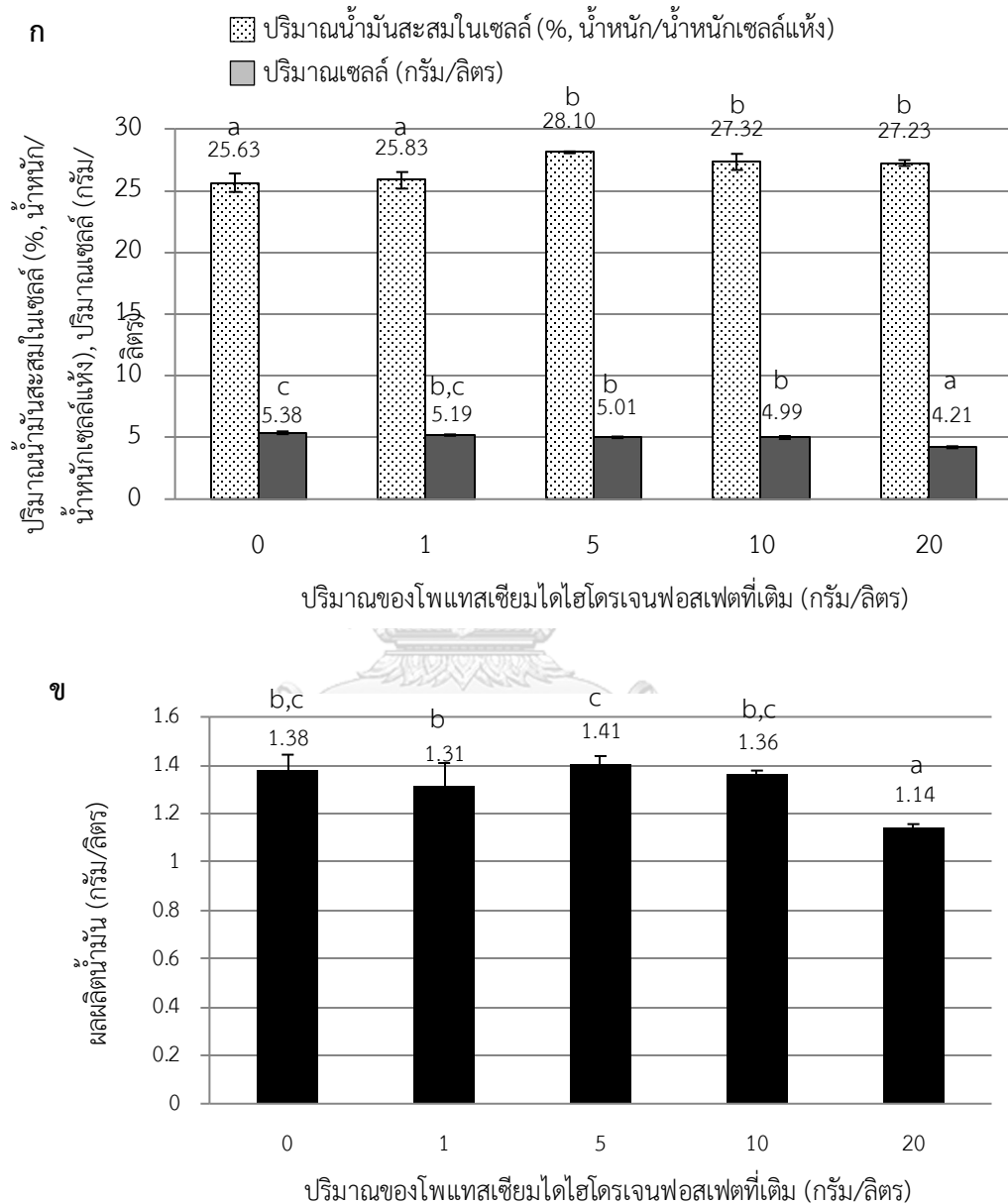


ภาพที่ 4.22 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน เท่ากับ ก) 24 และ ข) 60

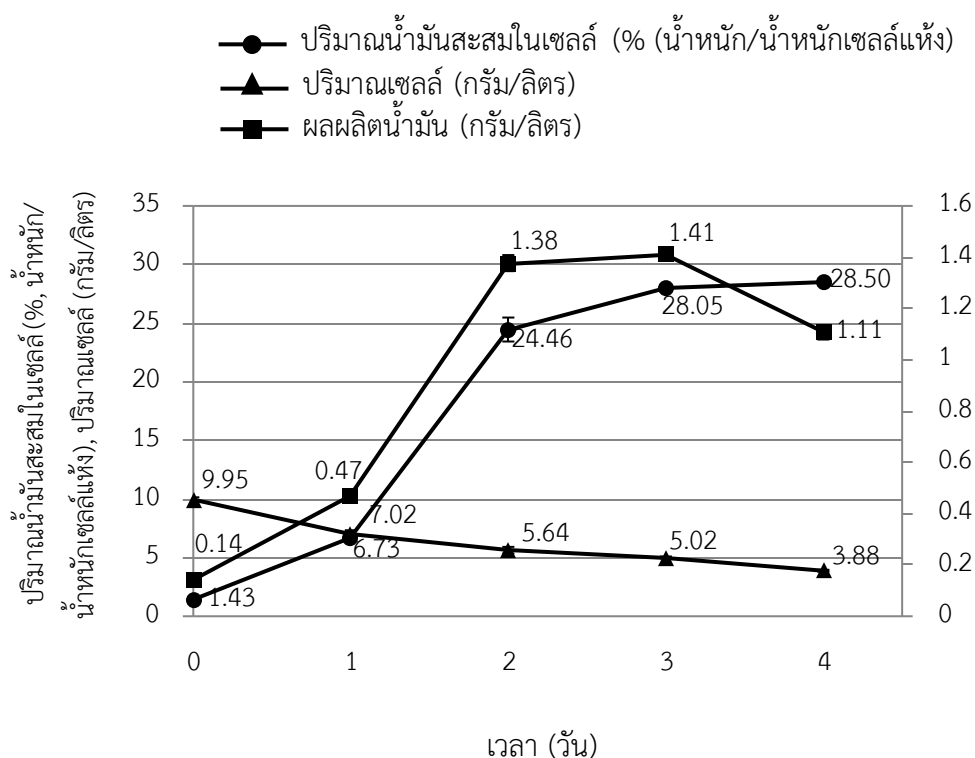
4.9.1.5 ผลของฟอสฟอรัสต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์มีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โคเอนไซม์ และโปรตีน (Liang และคณะ, 2013; Wang และคณะ, 2018b) รวมทั้งยังเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ เนื่องจากยีสต์อุดมไขมันจะสะสมไขมันในเซลล์รูปหยดไขมัน (oil droplet) (Sitepu และคณะ, 2014) ที่ห่อหุ้มด้วยฟอสโฟลิพิดโมโนเลเยอร์ (phospholipid monolayer) ซึ่งมีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ (Penno และคณะ, 2013) การทดลองนี้จึงศึกษาผลของการเติมฟอสฟอรัสลงใน 12%-SLH ต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 โดยแปรผันปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เติมลงใน 12%-SLH เป็น 0, 1, 5, 10 และ 20 กรัม/ลิตร ใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH บ่มนาน 3 วัน พบว่า *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุด 28.10% (น้ำหนัก/น้ำหนัก เซลล์แห้ง) และ ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด 1.41 กรัม/ลิตร ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4.23) และเมื่อแปรผันระยะเวลาการบ่มพบว่าระยะเวลาการบ่ม 3 วันเป็นระยะเวลาซึ่ง *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด

(1.41 กรัม/ลิตร) (ภาพที่ 4.24) ที่ภาวะนี้ 12%-SLH มีอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเท่ากับ 12 Pranamit และคณะ (2019) รายงานว่าการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม/ลิตรลงในไฮโดรไลเสตไบออย ทำให้ผลผลิตน้ำมันของ *Candida sp.* NG17 เพิ่มขึ้นจาก 2.3 กรัม/ลิตร เป็น 6.67 กรัม/ลิตร



ภาพที่ 4.23 ผลของปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เติมใน 12%-SLH ต่อ ก) ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ และปริมาณเซลล์ ข) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD ซึ่งได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.24 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณ และผลผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร

4.9.1.6 ผลของโลหะไอออนต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร

โลหะไอออน เช่น แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) แมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) เหล็กไอออน (Fe^{3+}) และ สังกะสีไอออน (Zn^{2+}) ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ในกระบวนการผลิตน้ำมันของยีสต์ (Jernejc และ Legiša, 2002) มีรายงานเกี่ยวกับผลของโลหะไอออนต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันดังนี้ Zhao และคณะ (2008) รายงานว่าการเติมเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ลงในอาหารผลิตน้ำมันที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส อัตราส่วน 2:1 เป็นแหล่งคาร์บอน ส่งเสริมการผลิตและสะสมน้ำมันของ *L. starkeyi* อย่างมีนัยสำคัญ Chen และคณะ (2013) รายงานว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) และ คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ปริมาณ 0.3 กรัม/ลิตร และ 3 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ลงในไฮโดรไลเสตซังข้าวโพดทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์และผลผลิตน้ำมันของ *T. cutaneum* เพิ่มขึ้น

การทดลองนี้จึงศึกษาผลของโลหะไอออน คือ แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก และสังกะสี ต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร ตามที่ได้ออกแบบการทดลองด้วย Plackett-Burman ผลการเจริญและการผลิตน้ำมันที่ได้จากทั้ง 8 ชุดการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.14 เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistica™ เพื่อวิเคราะห์หาค่าผลตอบสนอง และค่าความแปรปรวน พบว่าโลหะไอออนทั้ง 4 ชนิดที่ทดสอบไม่มีผลเชิงบวกต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 จึงไม่จำเป็นต้องเติมโลหะไอออนลงในไฮโดรไลสโตบิออย (ตารางที่ 4.15) ตารางที่ 4.14 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อเติมโลหะไอออนลงใน 12%-SLH ที่มีโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 5 กรัม/ลิตร

ชุดการทดลอง	X1	X2	X3	X4	ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ (% น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง)	ปริมาณเซลล์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)
1	+	-	-	+	25.22	5.16	1.30
2	+	+	-	-	26.58	4.99	1.33
3	+	+	+	-	26.23	4.97	1.30
4	-	+	+	+	25.83	4.29	1.11
5	+	-	+	+	25.71	4.11	1.06
6	-	+	-	+	26.49	3.45	0.91
7	-	-	+	-	26.92	4.79	1.29
8	-	-	-	-	27.89	5.00	1.40

หมายเหตุ: X1 คือ แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต

X2 คือ แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต

X3 คือ เฟอร์รัสซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต

X4 คือ ซิงค์ซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต

ตารางที่ 4.15 ค่าผลกระทบปัจจัยต่าง ๆ ต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อเติมโลหะไอออนลงใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 5 กรัม/ลิตร

ปัจจัย	ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ (% , น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง)		ปริมาณเซลล์ (กรัม/ลิตร)		ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)	
	Effect	p-value	Effect	p-value	Effect	p-value
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-0.8460	<0.01	0.4232	0.0173	0.0697	0.0934
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-0.1546	0.5015	-0.3378	0.0511	-0.0971	0.0237
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-0.3714	0.1163	-0.1085	0.5117	-0.0441	0.2784
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-1.0940	<0.01	-0.6865	<0.01	-0.2335	<0.01

หมายเหตุ: Effect คือ ค่าผลตอบสนอง

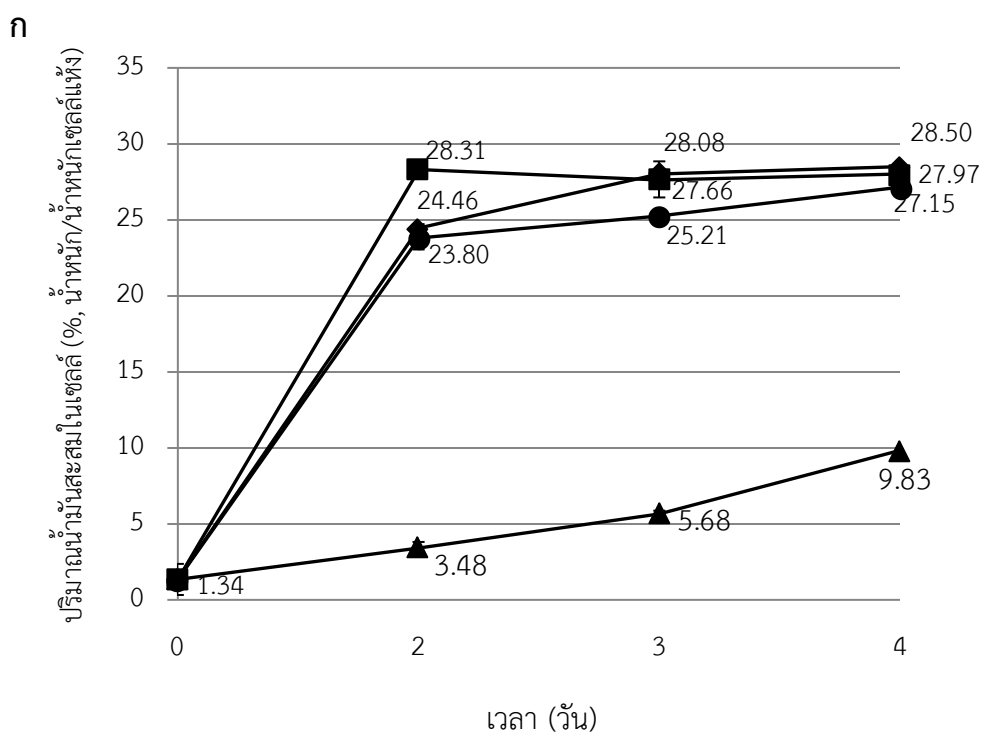
p-value คือ ค่าความแปรปรวนที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 99%

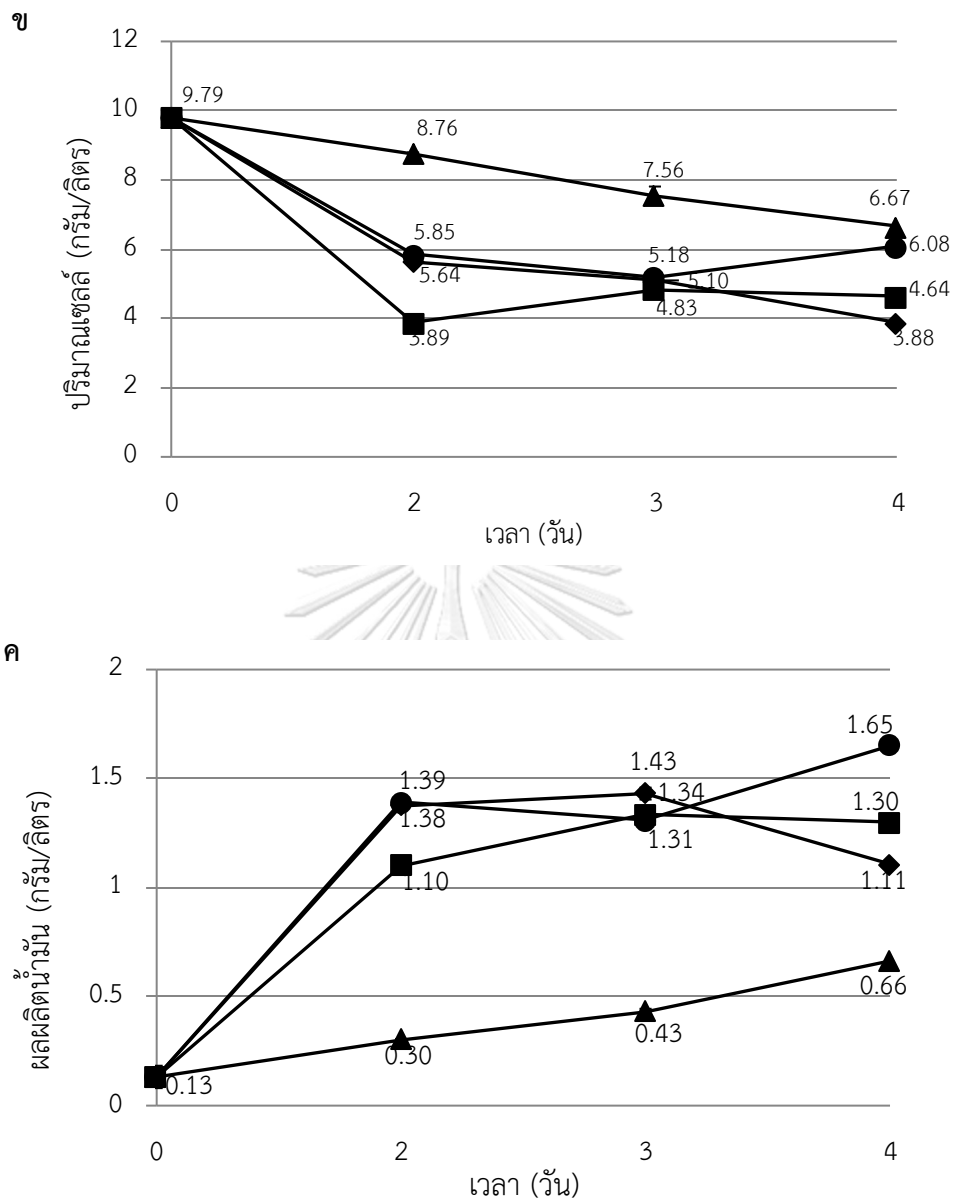
4.9.1.7 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร

ผลการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของ 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร เป็น 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 พบว่า *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 1.65 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 4.5 เมื่อป้อนาน 4 วัน อัตราการผลิตน้ำมัน 0.41 กรัม/ลิตร/วัน (ภาพที่ 4.25) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์อูดมน้ำมันมักอยู่ในช่วงค่าพีเอชที่เป็นกรด เช่น *Rh. glutinis* IIP-30 สะสมน้ำมันได้สูงสุด 66% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเจริญแบบกึ่งกะ (fed-bath) ในอาหารเหลวไนโตรเจนต่ำซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่พีเอช 4.0 (Johnson และคณะ, 1992) Angerbauer และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตน้ำมันของ *L. starkeyi* DSM 70295 ในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 40 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและมีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเท่ากับ 100 ที่แปรผันพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 5.0 ถึง 7.5 พบว่า *L. starkeyi* DSM 70295 ที่เจริญในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุด คือ 56% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าค่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์อูดมน้ำมันแต่ละสายพันธุ์นั้นอาจแตกต่างกันไป และขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Angebauer และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตน้ำมันอย่างแน่ชัด มีเพียงบางงานวิจัยระบุว่า การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชทำให้

องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจส่งผลต่อความสามารถในการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์ได้ Johnson และคณะ (1992) รายงานว่าเมื่อค่า พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณเออร์โกสเตอรอล (ergosterol) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง ซึ่งอาจส่งผลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ได้ ในขณะที่ Zhang และคณะ (2019) รายงานว่าการผลิตน้ำมันของ *Y. lipolytica* W29 เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเป็นกรด ขณะที่ความสามารถในการผลิตกรดซิตริกลดลงเมื่อค่าพีเอชเป็นกรด อย่างไรก็ตามพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำมันและกรดซิตริกเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชต่าง ๆ ไม่แตกต่างกัน แต่พบการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตซิเตรท (citrate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์น้ำมันนอกเซลล์ต่ำลง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเป็นกรด จึงเกิดการสะสมซิเตรทภายในเซลล์สูงขึ้น ทำให้การผลิตน้ำมันของยีสต์สูงขึ้น การผลิตน้ำมันได้ดีในภาวะการเพาะเลี้ยงที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็นกรด มีผลดีต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากช่วยลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างการผลิต (Sitepu และคณะ, 2014)

จากผลการทดลองที่ได้ จึงผลิตน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH โดยไม่ปรับอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน (อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเท่ากับ 24) เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเท่ากับ 30.06) พีเอชเริ่มต้น 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-DSLH แล้วนำน้ำมันที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในขั้นตอนถัดไป





ภาพที่ 4.25 ก) ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ข) ปริมาณเซลล์ และ ค) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม/ลิตร และแปรผันพีเอช เริ่มต้นเป็น 4.5 (●), 5.0 (■), 5.5 (◆) และ 6.0 (▲)

4.9.1.8 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4

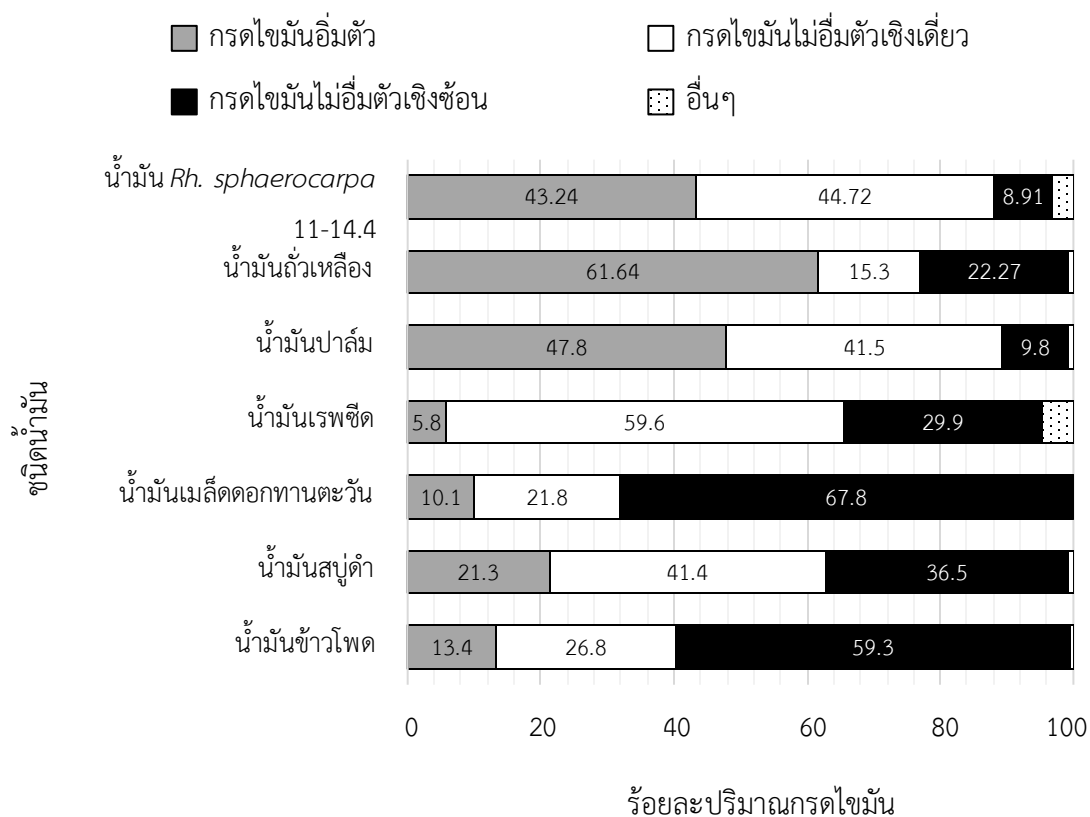
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ที่เจริญใน 12%-SLH เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5 เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตน้ำมัน (จากข้อ 4.9.1.7) พบว่าประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) 43.23% กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid) 44.80% และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) 8.91% (ภาพที่ 4.26) ชนิดของกรดไขมันที่พบ คือ กรดไมริสติก (C14:0) กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1 n9) และ กรดลิโนเลอิก (C18:2 n6) โดยกรดไขมันที่พบมีปริมาณมากที่สุด คือ กรดโอเลอิก 44.8% รองลงมา คือ กรดปาล์มิติก 35.89% และกรดลิโนเลอิก 8.91% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.16) เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตกับน้ำมันของยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ที่ผลิตในอาหารเหลือผลิตน้ำมัน (OPM) (ภาพที่ 4.14) พบว่าน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ที่ผลิตมีปริมาณกรดโอเลอิกสูงกว่า คือ เท่ากับ 55.68% แต่มีปริมาณกรดปาล์มิติกต่ำกว่า คือ เท่ากับ 18.86% ทั้งนี้ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ชนิดเดียวกันจะต่างกัน หากอาหารผลิตน้ำมัน ชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ภาวะการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาการบ่ม มีความแตกต่างกัน (Sitepu และคณะ, 2014) ปริมาณกรดโอเลอิกในน้ำมันของ *Sait. podzolica* (เดิม *Cryptococcus (Cr.) podzolicus*) CPOH4 ลดลงจาก 59.4% เป็น 55.1% เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนในอาหารผลิตน้ำมันจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลไซโลส (Schulze และคณะ, 2014)

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตกับน้ำมันของพืช 6 ชนิด คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันเรพซีด น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันข้าวโพด ซึ่งมีรายงานการถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซล (ภาพที่ 4.26) พบว่ามีความใกล้เคียงกับน้ำมันปาล์มมากที่สุด แต่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูงกว่า น้ำมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูง เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชันจะมีความคงตัวสูง (oxidative stability) และคงสถานะการไหลได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (cold flow) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ต้องการของน้ำมันที่จะนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล นอกจากนี้ น้ำมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูงเมื่อนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล ยังไม่มีผลทำให้เลขซีเทน (cetane number) ของไบโอดีเซลที่ได้ลดลง (Knothe, 2009; Pinzi และคณะ, 2009) ต่างจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ซึ่งหากน้ำมันที่นำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนมาก ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จะมีเลขซีเทนลดลง ไบโอดีเซลที่ดีควรมีเลขซีเทนสูง เพื่อให้การจุดระเบิดในเครื่องยนต์มีประสิทธิภาพ ไม่เกิดการสะสมของเขม่าและเขม่าในห้องเผาไหม้เครื่องยนต์ (Hoekman และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตามคุณภาพของไบโอดีเซลไม่สามารถระบุได้จาก

ปริมาณของกรดไขมันชนิดใดชนิดหนึ่ง เพราะค่าคุณสมบัติต่าง ๆ ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงคุณภาพของไบโอดีเซล มีความสัมพันธ์กับค่าเฉลี่ยของกรดไขมันหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน (Hoekman และคณะ, 2012)

ตารางที่ 4.16 ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อเจริญใน 12%-SLH ที่เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5

ชนิดกรดไขมัน	ปริมาณ (% น้ำหนัก/น้ำหนัก)
กรดไมริสติก (C14:0)	1.29 ± 0.01
กรดปาล์มิติก (C16:0)	35.89 ± 0.71
กรดสเตียริก (C18:0)	6.06 ± 0.58
กรดโอเลอิก (C18:1 n9)	44.72 ± 0.74
กรดลิโนเลอิก (C18:2 n6)	8.91 ± 0.55
กรดไขมันอื่น ๆ	3.13 ± 0.15



ภาพที่ 4.26 ปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน และ กรดไขมันอื่น ๆ ในน้ำมันของยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อเจริญใน 12%-SLH ที่เติม โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5 เปรียบเทียบกับน้ำมันของพืชที่ใช้ผลิตเป็นไบโอดีเซล

4.9.1.9 ค่าสมบัติเชิงทำนายของไบโอดีเซลที่จะผลิตได้จากน้ำมัน *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ที่ผลิตภายใต้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.9.1.7

ผลการคำนวณค่าสมบัติเชิงทำนายของน้ำมันของยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เพื่อบ่งชี้ถึงคุณภาพของไบโอดีเซลที่จะได้ ได้แก่ ความหนืด (viscosity) ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) จุดหมอก (cloud point) เลขซีเทน (cetane number) เลขไอโอดีน (iodine number) และค่าความร้อนสูง (higher heating value) ตามสมการของ Hoekman และคณะ (2012) โดยใช้ข้อมูลชนิดและปริมาณกรดไขมันในน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ที่ได้ จากข้อ 4.9.1.8 พบว่าไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันของยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 จะมีค่า

ความหนืด 4.81 ตารางมิลลิเมตร/วินาที ความถ่วงจำเพาะ 0.876 จุดหมอกที่ 11.64 องศาเซลเซียส เลขซีเทน 58.71 เลขไอโอดีน 59.22 และค่าความร้อนสูง 39.63 เมกะจูล/กิโลกรัม (ตารางที่ 4.17) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชและน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันสายพันธุ์อื่น ๆ พบว่าความหนืด ความถ่วงจำเพาะ เลขซีเทน และค่าความร้อนสูง ใกล้เคียงกัน และอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานไบโอดีเซลของสหรัฐอเมริกา ยุโรป และไทย ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีจุดหมอกสูงกว่า แต่ต่ำกว่าจุดหมอกของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีรายงานว่าเป็นน้ำมันที่ผลิตจากพืชน้ำมันซึ่งมีจุดหมอกสูงที่สุด (Hoekman และคณะ, 2012) จุดหมอก คือ อุณหภูมิต่ำที่สุดที่น้ำมันเริ่มแข็งตัว จุดหมอกมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการไหลของน้ำมันที่อุณหภูมิต่ำ น้ำมันที่มีค่าจุดหมอกสูงจะไหลได้ยากที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้เกิดการอุดตันที่ไส้กรองน้ำมัน อย่างไรก็ตามมาตรฐานไบโอดีเซลของสหรัฐอเมริกา ยุโรป และไทยไม่ได้กำหนดค่าจุดหมอกที่แน่นอน เนื่องจากแต่ละภูมิภาคมีอุณหภูมิในแต่ละฤดูแตกต่างกัน (Hoekman และคณะ, 2012) ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 มีเลขไอโอดีนสูงกว่าไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม แต่ต่ำกว่าไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันเรพซิด น้ำมันสบู่ดำ น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมันสายพันธุ์อื่น ๆ แต่ยังคงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของไบโอดีเซล ที่กำหนดให้มีค่าสูงสุดไม่เกิน 120 เลขไอโอดีนของไบโอดีเซลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมันที่นำมาผลิต ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจะมีเลขไอโอดีนสูง ซึ่งแสดงว่าไม่เสถียรต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือมีค่า oxidative instability สูง (Hoekman และคณะ, 2012) จากผลการวิเคราะห์ค่าคุณสมบัติที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงคุณภาพของไบโอดีเซลที่จะผลิตได้จากน้ำมันของยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ที่เจริญในไฮโดรไลสโตไบอ้อยที่ภาวะเหมาะสม พบว่ามีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

ตารางที่ 4.17 ค่าสมบัติต่าง ๆ ของไปโอติเซลล์ที่ผลิตจากน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เปรียบเทียบกับไปโอติเซลล์ที่ผลิตจากน้ำมันของยีสต์
อุดมน้ำมันสายพันธุ์อื่น ๆ น้ำมันปาล์ม น้ำมันเรพซีด น้ำมันถั่วเหลือง และมาตรฐานไปโอติเซลล์

น้ำมัน	ความหนืด (ตารางมิลลิเมตร/ วินาที)	ความ ถ่วงจำเพาะ	จุดหมอก (องศา เซลเซียส)	เลขซีเทน	เลข ไอโอดีน	ค่าความร้อนสูง (เมกะจูล/กิโลกรัม)	อ้างอิง
<i>Rh. sphaerocarpa</i> 11-14.4	4.81	0.876	11.64	58.71	59.22	39.63	งานวิจัยนี้
<i>Cryptococcus</i> sp. JCM 24511	4.72	0.877	9.78	57.55	69.61	39.88	Tanimura และคณะ (2014)
<i>Pap. laurentii</i> AM113	4.62	0.878	7.49	65.63	81.39	40.18	Wang และคณะ (2018a)
<i>L. starkeyii</i> NBRC 10381	4.61	0.878	7.38	56.58	82.93	40.2	Tanimura และคณะ (2014)
<i>R. toruloides</i> NBRC 0559	4.65	0.8774	8.27	57.02	77.99	40.08	Tanimura และคณะ (2014)
ปาล์ม	4.61	0.873	14	61.9	54	40.6	Hoekman และคณะ (2012)
เรพซีด	4.5	0.879	-4	53.7	116.1	41.1	Hoekman และคณะ (2012)

ตารางที่ 4.17 (ต่อ)

น้ำมัน	ค่าความหนืด (ตารางมิลลิเมตร/ วินาที)	ความ ถ่วงจำเพาะ	จุดหมอก (องศา เซลเซียส)	เลขซีเทน	เลข ไอโอดีน	ค่าความร้อนสูง (เมกะจูล/ กิโลกรัม)	อ้างอิง
สูญค่า	4.75	0.876	5	55.7	109.5	40.7	Hoekman และ คณะ (2012)
ถั่วเหลือง	4.26	0.882	0	51.3	125.5	39.7	Hoekman และ คณะ (2012)
มาตรฐานไบโอดีเซล ASTM D6751 ประเทศ สหรัฐอเมริกา	1.9-6.0	-	-	ไม่ต่ำกว่า 47	-	-	Hoekman และ คณะ (2012)
มาตรฐานไบโอดีเซล EN 14214 ยุโรป	3.5-5.0	0.86-0.9	-	ไม่ต่ำกว่า 51	ไม่สูงเกิน 120	-	Hoekman และ คณะ (2012)
มาตรฐานไบโอดีเซล พ.ศ. 2562ประเทศ ไทย	3.5-5.0	-	-	ไม่ต่ำกว่า 51	ไม่สูงเกิน 120	-	กรมธุรกิจ พลังงาน (2562)

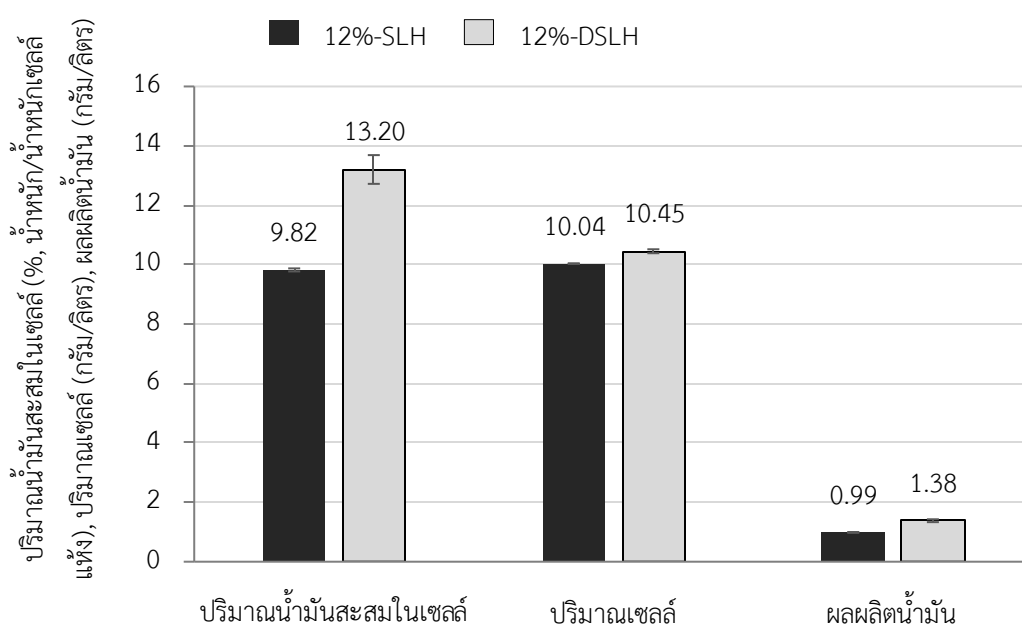
4.9.2 *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2

4.9.2.1 ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-SLH และ 12%-SLH ที่ผ่านการปรับต่างกัน (12%-DSLH)

การผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ในอาหารเหลว HighC/N ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 5% สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% NaCl 0.01% CaCl_2 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 5.5 ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนเท่ากับ 627 มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ใช้กล้าเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว YM พบว่าได้ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เท่ากับ 20.12% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ผลผลิตน้ำมันเท่ากับ 1.27 กรัม/ลิตร (รัชนา พระนิมิตร, 2560) เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารเหลว HighC/N และ 12%-SLH พบว่า 12%-SLH มีปริมาณคาร์บอนต่ำกว่าแต่มีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสูงกว่าอาหารเหลว HighC/N ดังนั้นอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน และอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสของ 12%-SLH จึงต่ำกว่าของอาหารเหลว HighC/N เนื่องจากเมื่ออาหารที่ยีสต์เจริญอยู่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน หรือ อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส สูงจึงจะเป็นภาวะที่กระตุ้นให้ยีสต์ผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ (Kolouchová และคณะ, 2015) ดังนั้นจึงนำ 12%-SLH มาปรับต่างกันด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อลดปริมาณของฟอสฟอรัส ซึ่งจะมีผลให้ 12%-DSLH มีอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสสูงขึ้น แล้วเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-SLH และใน 12%-DSLH ไฮโดรไลเสตของลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการปรับต่างกันมีปริมาณฟอสฟอรัสลดลง (Wu และคณะ, 2010a)

ผลการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-SLH เปรียบเทียบกับใน 12%-DSLH ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-SLH ที่เติมสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.3% และเพปโทน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่า *Cy. subsufficiens* NG8.2 ที่เจริญใน 12%-DSLH (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เท่ากับ 21,182) ให้ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน เท่ากับ 13.20% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) 10.45 กรัม/ลิตร และ 1.38 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.27) สูงกว่าใน 12%-SLH (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เท่ากับ 194) ซึ่งพบว่ามีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์และให้ผลผลิตน้ำมันเพียง 9.82% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 0.99 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยก่อนหน้าดังนี้ ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์และผลผลิตน้ำมันของ *Cr. curvatus* MUCL 29819 ที่เจริญในอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนต่ำเพิ่มขึ้นจาก 18.3% เป็น 30.3% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ จาก 0.64 เป็น 0.92 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/

ฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นจาก 18 เป็น 1,482 ตามลำดับ (Huang และคณะ, 2018) *R. toruloides* Y4 ผลิตน้ำมันในอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนต่ำ (6.1) มากขึ้นเมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสของอาหารเพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 62.2% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นเป็น 9,522 (Wu และคณะ, 2010) เลือกผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ในการทดลองถัดไป

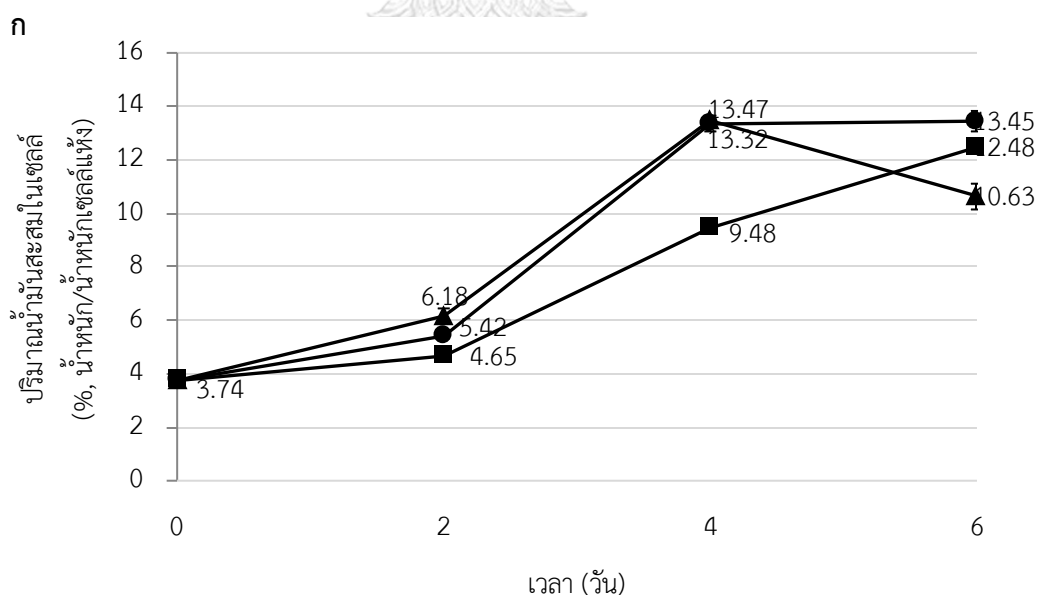


ภาพที่ 4.27 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน ของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-SLH และ 12%-DSLH

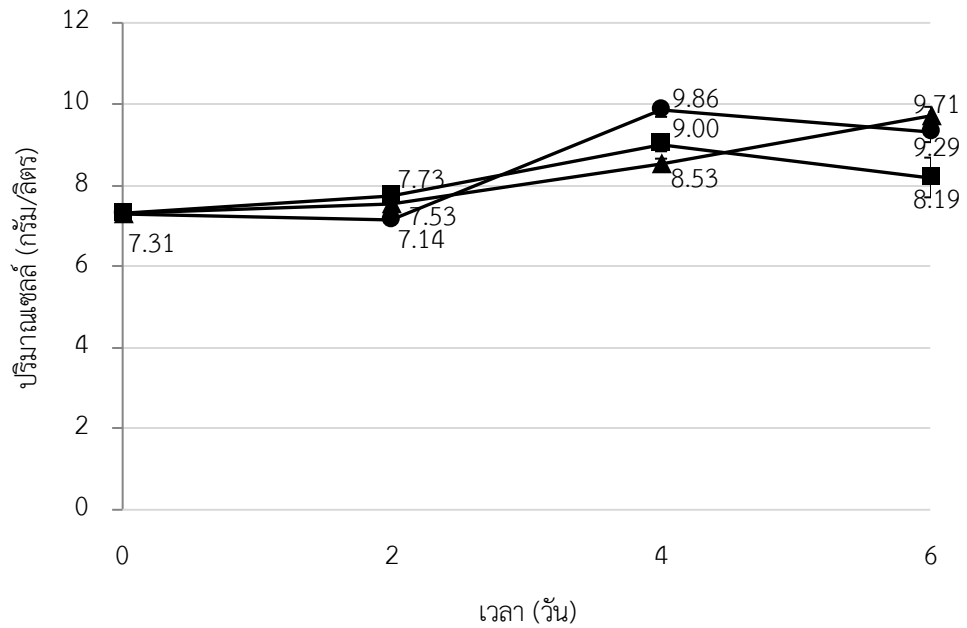
4.9.2.2 ผลการหาอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมัน *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH

ผลการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่แปรผันอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเริ่มต้นเป็น 21,182, 24,616 และ 27,693 (12%-DSLH มีอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เท่ากับ 21,182) โดยการเติมน้ำตาลกลูโคสลงใน 12%-DSLH เพื่อให้ปริมาณคาร์บอนสูงขึ้น ใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-SLH ที่เติมสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 0.3% เพปโทน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์และผลผลิตน้ำมันทุก 2 วัน เมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสของ 12%-DSLH เพิ่มขึ้นจาก 21,182 เป็น 24,616 *Cy. subsufficiens* NG8.2 ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดในวันที่ 4 แต่ผลผลิตน้ำมันสูงสุดที่ได้ ลดลงเหลือเพียง 1.15 จากเดิม 1.33 กรัม/ลิตร ทั้งนี้เป็นเพราะปริมาณเซลล์ลดลงจาก 9.86 เป็น 8.53 กรัม/ลิตร แม้ว่าปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์จะเพิ่มขึ้นจาก 13.32% เป็น

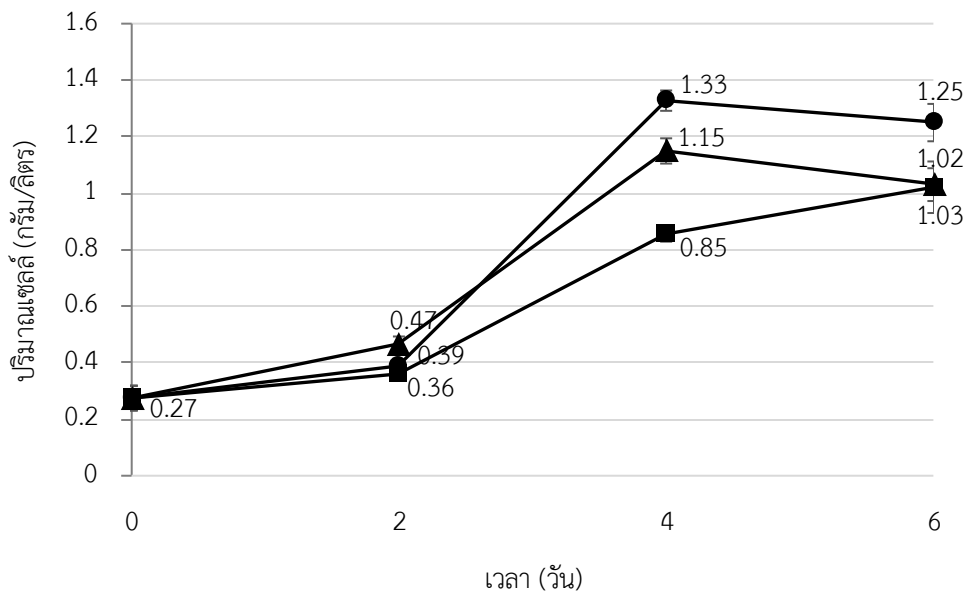
13.47% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และเมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสของ 12%-DSLH เพิ่มขึ้นเป็น 27,693 พบว่าผลผลิตน้ำมันสูงสุดซึ่ง *Cy. subsufficiens* NG8.2 ผลิตได้ลดลงเป็น 1.02 กรัม/ลิตร ในวันที่ 6 วัน ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์และปริมาณเซลล์ เท่ากับ 12.48% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 8.19 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.28) การสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของ ยีสต์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสของอาหารผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นจนถึงอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วต่อจากนั้นจะลดลง การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง สอดคล้องกับ Bao และคณะ (2018) ซึ่งศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส ต่อการผลิติดน้ำมันของ *T. fermentans* ในอาหารผลิตน้ำมันที่มีน้ำตาลฟรุกโตส 70 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นจาก 88 เป็น 6342 มีผลให้ *T. fermentans* มีปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเพิ่มขึ้นจาก 8.1% เป็น 44.0% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่ทำให้ปริมาณเซลล์ลดลงจาก 22.7 เป็น 15.4 กรัม/ลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสขึ้นเป็น 31,709 ปริมาณน้ำมันที่ *T. fermentans* สะสมในเซลล์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย คือ เท่ากับ 45.3% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ขณะที่ปริมาณเซลล์ลดลงเหลือเพียง 12.7 กรัม/ลิตร จึงเลือกผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่ไม่ปรับอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส



ข



ค

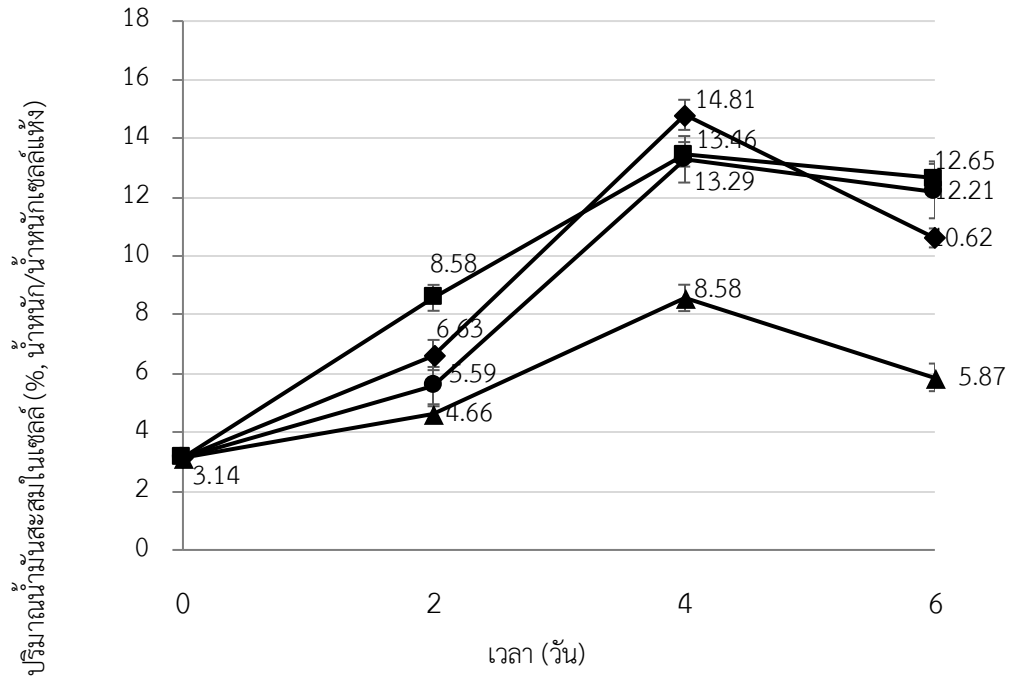


ภาพที่ 4.28 ก) ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ข) ปริมาณเซลล์ และ ค) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่แปรผันอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เป็น 21,182 (●), 24,616 (▲) และ 27,693 (■)

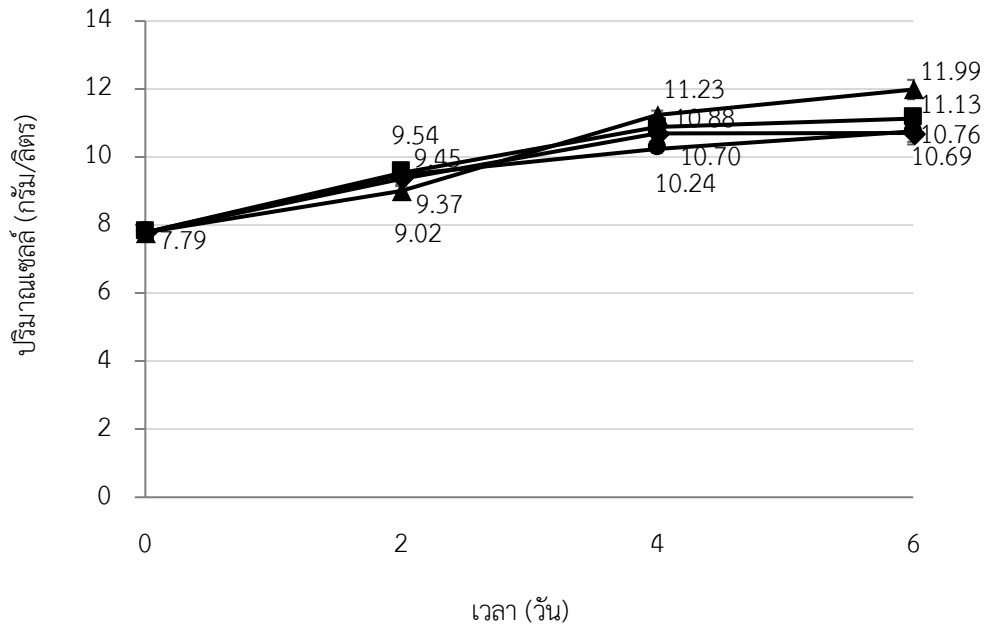
4.9.2.3 ผลของแมกนีเซียมต่อการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH

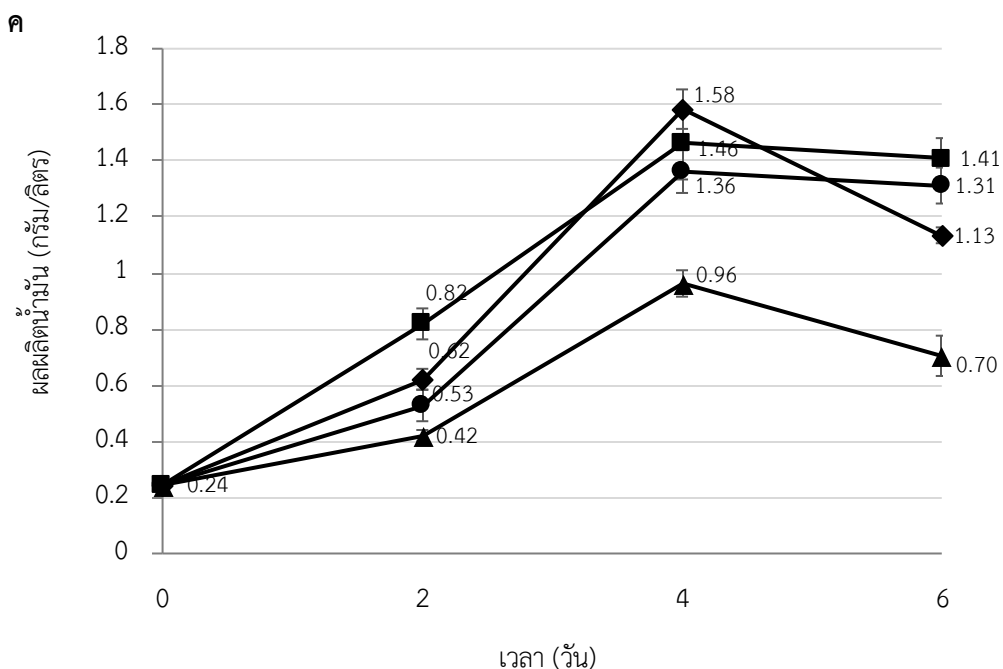
แมกนีเซียมเป็นโลหะไอออนที่มีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำมัน (Jernejc และ Legiša, 2002) โดยทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ATP-citrate lyase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์น้ำมันในยีสต์อุตสาหกรรม (Amaretti และคณะ, 2010) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ที่พบในอาหารเหลว HighC/N และ 12%-DSLH พบว่าใน HighC/N มีปริมาณแมกนีเซียมไอออนเท่ากับ 0.049 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่าที่พบใน 12%-DSLH (0.0019 กรัม/ลิตร) คิดเป็น 96.12% การทดลองนี้จึงศึกษาผลของการเติมแมกนีเซียมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 โดยแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตที่เติมลงใน 12%-DSLH เป็น 0, 0.5, 0.75 และ 1 กรัม/ลิตร พบว่าการเติมแมกนีเซียมส่งผลให้การผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 สูงขึ้น (ภาพที่ 4.29ก และ ภาพที่ 4.29ข) *Cy. subsufficiens* NG8.2 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ และผลผลิตน้ำมันสูงขึ้นจาก 13.29% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 1.36 กรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงใน 12%-DSLH ที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต นาน 4 วัน เป็น 13.46% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 1.46 กรัม/ลิตร และ 14.80% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 1.58 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงใน 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ปริมาณ 0.5 และ 0.75 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อบ่มนาน 4 วัน แต่เมื่อปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตที่เติมลงไป ใน 12%-DSLH เพิ่มขึ้นเป็น 1.0 กรัม/ลิตร ส่งผลให้ปริมาณน้ำมันสะสมและผลผลิตน้ำมันในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงลดลงเหลือ 8.58% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 0.96 กรัม/ลิตร ในขณะเดียวกันพบว่าในภาวะดังกล่าวส่งผลให้การเจริญของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 เพิ่มขึ้นสูงสุด โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 11.99 กรัม/ลิตร ในวันที่ 6 (ภาพที่ 4.29ค) แมกนีเซียมมีบทบาทเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์มากกว่า 300 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ของเซลล์ (Walker, 1994) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปริมาณแมกนีเซียมในอาหารผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นจนถึงปริมาณที่เหมาะสม จากนั้นการผลิตน้ำมันจะลดลง Chen และคณะ (2013) รายงานว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ปริมาณ 0.3 กรัม/ลิตร ลงในไฮโดรไลเสตซังข้าวโพดทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์และผลผลิตน้ำมันของ *T. cutaneum* เพิ่มขึ้นสูงสุด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.75 กรัม/ลิตร

ก



ข



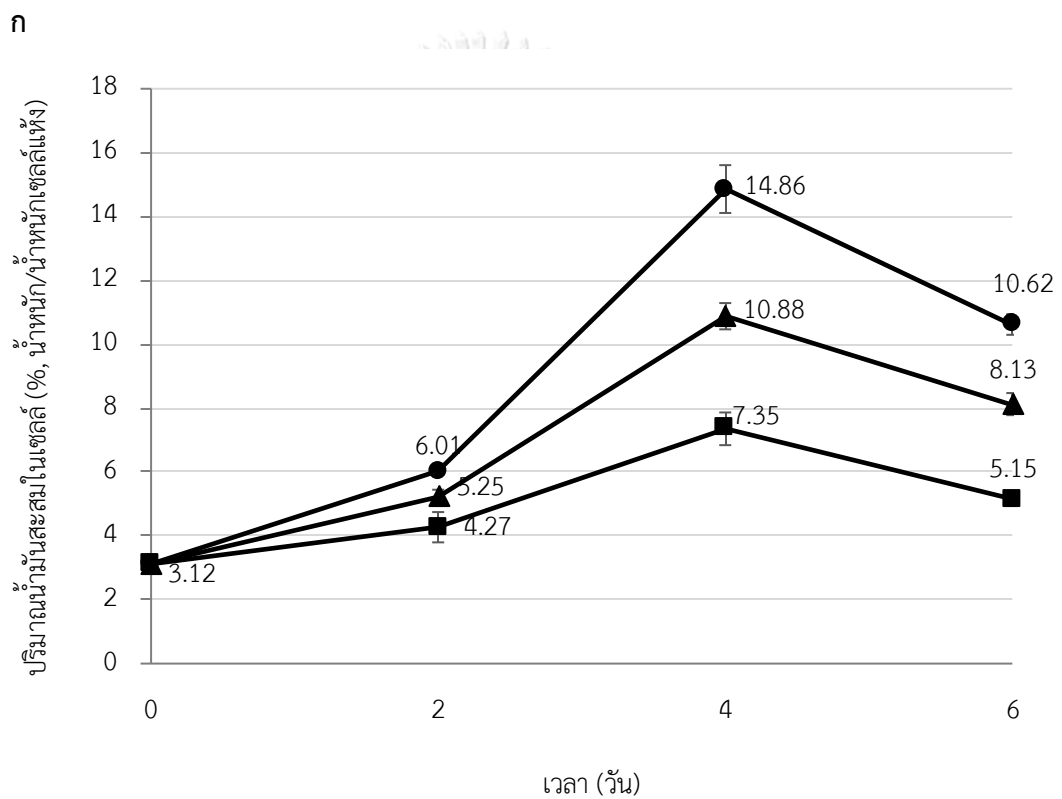


ภาพที่ 4.29 ก) ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ข) ปริมาณเซลล์ และ ค) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตเป็น 0 (●), 0.5 (■), 0.75 (◆) และ 1.0 (▲) กรัม/ลิตร

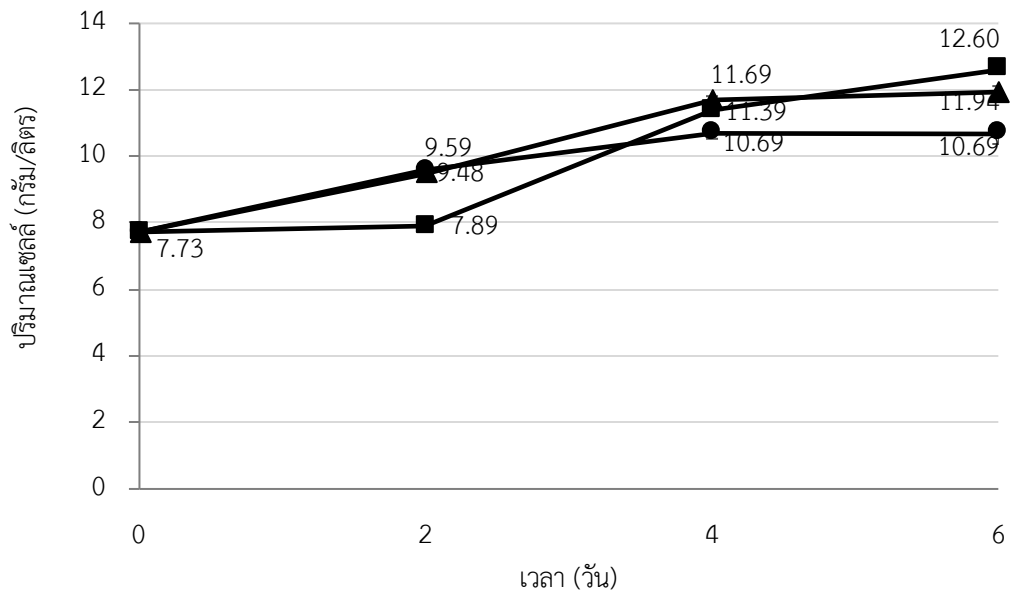
4.9.2.4 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 0.75 กรัม/ลิตร

ผลการแปรผันพีเอชเริ่มต้นของ 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 0.75 กรัม/ลิตร เป็น 4.5, 5.5 และ 6.0 พบว่า *Cy. subsufficiens* NG8.2 ให้ผลผลิตน้ำมันและปริมาณน้ำมันสะสมสูงที่สุดเท่ากับ 1.59 กรัม/ลิตร และ 14.86% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 เมื่อบ่มนาน 4 วัน (ภาพที่ 4.30) ซึ่งสูงกว่าที่ผลิตได้ที่พีเอชเริ่มต้น 4.5 และ 6.0 อย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์อุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น *Rh. kratochvilovae* SY89 สะสมน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 56.06% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเจริญในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำ ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 (Jiru และคณะ, 2017) *Rh. toruloides* DMAKU3-TK16 สะสมน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 71.30% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเจริญในอาหารที่มีอัตราส่วนกลูโคส/ไนโตรเจนเท่ากับ 140 ค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 (Kraisintu และคณะ, 2010) และ *Cr. Curvatus* ให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุด 1.7 กรัม/ลิตร เมื่อเจริญใน

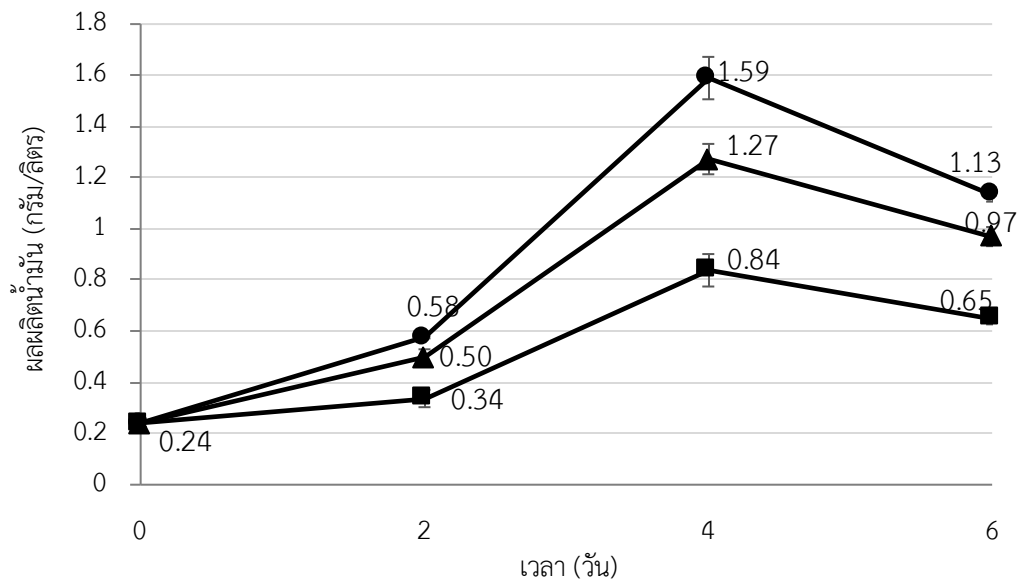
อาหารที่มีโมลาสจากหัวบีทเป็นแหล่งคาร์บอนและกลูเตนข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 (El-Fadaly และคณะ, 2009) จากผลการทดลองที่ได้ จึงผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเท่ากับ 21,182) เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 0.75 กรัม/ลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน ใช้กล้าเชื้อที่เจริญใน 6%-SLH แล้วนำน้ำมันที่ได้มาวิเคราะห์หองค์ประกอบกรดไขมันในขั้นตอนถัดไป



ข



ค



ภาพที่ 4.30 ก) ปริมาณน้ำมันสะสมใน ข) ปริมาณเซลล์ และ ค) ผลผลิตน้ำมัน ของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ใน 12%-DSLH ที่ไม่ปรับอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เต็มแมกนีเซียม ซัลเฟตไฮเดรตปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร และแปรผันพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 (■), 5.5 (●) และ 6.0 (▲)

4.9.2.5 ผลการเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ในไฮโดรไลเสตไบอ้อยชนิดต่าง ๆ

จากผลการทดลองข้อ 4.9.2.1 ถึง 4.9.2.4 พบว่าอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส ปริมาณแมกนีเซียม และพีเอชเริ่มต้นของไฮโดรไลเสตไบอ้อยส่งผลต่อการสะสมน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 การทดลองนี้จึงผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบอ้อย 3 ชนิด คือ 12%-SLH, 12%-DSLH และ 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหารทุกชนิดเท่ากับ 5.5 บ่มแบบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิต ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันแสดงดังตารางที่ 4.18 น้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ที่เจริญในไฮโดรไลเสตไบอ้อยทั้ง 3 ชนิด มีชนิดของกรดไขมันคล้ายกัน คือ กรดไมริสติก (C14:0) กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) กรด สเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) แต่มีปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดต่างกัน โดยกรดไขมันที่พบปริมาณมากในน้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ที่เจริญใน 12%-SLH คือ กรดโอเลอิก (31.69%) รองลงมา คือ กรดปาล์มิติก (28.10%) แต่กรดไขมันที่พบปริมาณมากเมื่อเจริญใน 12%-DSLH และ 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร คือ กรดปาล์มิติก (42.71% และ 46.59%) รองลงมา คือ กรดโอเลอิก (31.62% และ 24.42%) ตามลำดับกรดไขมันที่พบปริมาณเล็กน้อยในน้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ที่เจริญในไฮโดรไลเสตไบอ้อยทั้ง 3 ชนิด คือ กรดไมริสติก และกรดสเตียริก โดยพบเพียง 1.0 – 1.79% และ 2.46 – 3.31% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ที่เจริญในไฮโดรไลเสตไบอ้อยทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณกรดไขมันปาล์มิโตเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันราคาแพง ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยใน 12%-SLH ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่จำกัดฟอสฟอรัส (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เท่ากับ 194) น้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 มีกรดปาล์มิโตเลอิก 18.73% แต่ใน 12%-DSLH ซึ่งเป็นภาวะจำกัดฟอสฟอรัส (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เท่ากับ 21,182) ปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิกลดลงเหลือเพียง 12.45% คิดเป็นลดลง 33.52% ทั้งนี้อาจเนื่องจากใน 12%-DSLH นอกจากฟอสเฟตจะถูกตกตะกอนออกไปในระหว่างการปรับค่าเกินแล้ว คาร์บอน ไนโตรเจน รวมทั้งธาตุอาหารรองต่าง ๆ ก็ถูกจำกัดออกไปด้วย (ตารางที่ 4.13) จึงส่งผลต่อชนิดและปริมาณกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตได้ โดยองค์ประกอบของอาหารผลิตน้ำมัน ทั้งชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและของแหล่งไนโตรเจน ปริมาณธาตุอาหาร ภาวะการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาการบ่ม ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตได้ในยีสต์ชนิดเดียวกันแตกต่างกัน (Sitepu และคณะ, 2014) Kolouchová และคณะ (2015) รายงานว่าน้ำมันของยีสต์อุดมน้ำมัน 2 ชนิด คือ

Y. lipolytica CCY 29-26-36 และ *C. krusei* DBM 2163 ที่ผลิตในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน 2 ชนิด ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน เท่ากัน คือ 30 แต่มีอัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส แตกต่างกัน มีปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิกแตกต่างกัน โดยเมื่ออัตราส่วนของคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เพิ่มขึ้นจาก 6 เป็น 1043 ทำให้ปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิกลดลงจาก 16.4% เป็น 14.9% และ จาก 16.0% เป็น 14.4% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากรดปาล์มิติกที่พบในน้ำมันของ *Cr. curvatus* MUCL 29819 ที่เจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงแต่มีปริมาณฟอสฟอรัสจำกัด (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เท่ากับ 1482) ลดลงจาก 16.77% ที่ผลิตได้ในภาวะปกติ (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัส เท่ากับ 18) เป็น 12.64% (Huang และคณะ, 2018)

เมื่อเติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร ลงใน 12%-DSLH พบว่าปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ ปริมาณเซลล์ และผลผลิตน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 สูงขึ้นจากที่ผลิตได้ใน 12%-DSLH นอกจากนั้นปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิกยังเพิ่มขึ้นเป็น 15.80% สูงกว่าในน้ำมันที่ผลิตใน 12%-DSLH คิดเป็น 26.91% แม้ว่าปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิกในน้ำมันยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ที่เจริญใน 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร จะต่ำกว่าในน้ำมันที่ผลิตใน 12%-SLH คิดเป็น 15.64% แต่เนื่องจากปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ และปริมาณเซลล์ที่ได้สูงกว่าใน 12%-SLH จึงทำให้ผลผลิตกรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic yield) ที่ได้ (2.09 มิลลิกรัม/กรัมไบโอบีโอสแห้ง) สูงกว่าใน 12%-SLH ที่ผลิตกรดปาล์มิโตเลอิกได้ 1.54 มิลลิกรัม/กรัมไบโอบีโอสแห้ง Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ของ fatty acyl CoA synthetase ทำหน้าที่เปลี่ยน free fatty acid ไปเป็น fatty acyl CoA โดยการทำงานร่วมกับ โคเอนไซม์เอ (CoA) (Palmitic acid เปลี่ยนเป็น palmitoyl CoA) ต่อจากนั้น palmitoyl CoA จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid) โดยการทำงานของ Delta 9 desaturase (Vance และ Vance, 1996) สรุปลักษณะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดปาล์มิโตเลอิกของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ในไฮโดรไลเสตไบโอบีโอส คือ เพาะเลี้ยงใน 12%-DSLH (อัตราส่วนคาร์บอน/ฟอสฟอรัสเท่ากับ 21,182) เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.5 บ่มแบบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

ตารางที่ 4.18 เปรียบเทียบชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG8.2 เมื่อเจริญใน 12%-SLH, 12%-DSLH และ 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต ปริมาณ 0.75 กรัม/ ลิตร

ชนิดกรดไขมัน	ปริมาณ (% น้ำหนัก/น้ำหนัก)		
	12%-SLH	12%-DSLH	12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต 0.75 กรัม/ลิตร
กรดไมริสติก (C14:0)	1.00 + 0.01	1.37 + 0.05	1.79 + 0.11
กรดปาล์มิติก (C16:0)	28.10 + 2.31	42.71 + 0.43	46.59 + 1.35
กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1)	18.73 + 1.88	12.45 + 0.70	15.80 + 0.43
กรดสเตียริก (C18:0)	2.46 + 0.07	2.37 + 0.70	3.31 + 1.00
กรดโอเลอิก (C18:1)	31.69 + 1.10	31.62 + 0.37	24.42 + 0.24
กรดลิโนเลอิก (C18:2)	14.52 + 0.35	7.08 + 0.09	4.57 + 0.14
กรดไขมันอื่น ๆ	3.51	2.42	3.51

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ยีสต์จำนวน 223 ไอโซเลตถูกคัดแยกได้จากตัวอย่างดิน น้ำ และวัสดุชีวภาพอื่น ๆ จำนวน 223 ตัวอย่าง ที่เก็บได้จากแหล่งธรรมชาติ 9 แห่ง ได้แก่ สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัดจันทบุรี สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัดตราด สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัดระนอง สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด พื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จังหวัดระนอง และวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จากนั้นศึกษารูปแบบลายพิมพ์ DNA ของยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดจากแต่ละแหล่งตัวอย่างด้วยเทคนิค Repetitive element sequence-based PCR (Rep-PCR) เพื่อจัดกลุ่มตามรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แล้วเลือกตัวแทนของยีสต์แต่ละกลุ่มแบบสุ่มเพื่อระบุเอกลักษณ์ของยีสต์ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 บนยีน 26S rRNA พบว่าสามารถจัดจำแนกเป็นยีสต์ทราบชนิด (known species) ได้ทั้งหมด 18 จีนัส 48 สปีชีส์ และยีสต์สปีชีส์ใหม่ (potential new species) จำนวน 11 สปีชีส์ ยีสต์ที่พบมากที่สุด 3 ลำดับแรก คือ *Kluyveromyces siamensis*, *Candida tropicalis* และ *Candida thaimueangensis*

ยีสต์ 47 สายพันธุ์ในกลุ่มจีนัสที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเป็นยีสต์อุดมน้ำมัน ได้แก่ *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Saitozyma*, *Papiliotrema*, *Naganishia*, *Kwoniella* และ *Debaryomyces* ที่คัดแยกได้ และยีสต์ที่คาดว่าจะเป็ยีสต์สปีชีส์ใหม่ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ ถูกนำมาคัดกรองยีสต์อุดมน้ำมันด้วยวิธีการย้อมสีหยดน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ พบยีสต์ 16 สายพันธุ์มีหยดน้ำมันที่มีขนาดใหญ่กว่าครึ่งหนึ่งของขนาดเซลล์ จึงเลือกไปผลิตน้ำมันในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน (OPM) โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two stage fermentation) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่ยีสต์สะสมภายในเซลล์ ยีสต์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Papiliotrema laurentii* N-16.2, *Rhodotorula sphaerocarpa* 11-14.4, *Saitozyma podzolica* 11-11.3.1 และ *Sait. podzolica* N-8.4 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์มากกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) คือ ผลิตได้ 23.18%, 27.30%, 24.42% และ 20.30% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ จึงถูกจัดเป็นยีสต์อุดมน้ำมัน เมื่อวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่ยีสต์อุดมน้ำมันทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตได้ พบว่าน้ำมันยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4, *Pap. laurentii* N16-2 และ *Sait. podzolica* N-8.4 มีกรดปาล์มิติก กรดสเตียริก และกรดโอเลอิก เป็นองค์ประกอบหลักคล้ายกับน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ที่มีรายงานการใช้เป็นวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นน้ำมันของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์จึงเหมาะสำหรับการ

ผลิตไบโอดีเซล ในขณะที่น้ำมันยีสต์ *Sait. podzolica* 11-11.3.1 มีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวคล้ายกับไขมันที่สกัดได้จากเมล็ดโกโก้หรือเรียกว่าเนยโกโก้ จึงเหมาะที่จะนำไปใช้เป็นน้ำมันทดแทนในอุตสาหกรรมอาหาร การแพทย์และเครื่องสำอาง

ไบอ้อย ซึ่งเป็นชีวมวลลิกโนเซลลูโลสที่พบมากในประเทศไทย ถูกนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตน้ำมันของยีสต์อุดมไขมัน ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไบอ้อย พบว่ามีเซลลูโลส 38.8% เฮมิเซลลูโลส 23.5% และลิกนิน 13.8% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เป็นองค์ประกอบ ขณะเดียวกันไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่เตรียมได้ (12%-SLH) มีน้ำตาล 4 ชนิด เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส 16.6 กรัม/ลิตร น้ำตาลไซโลส 15.87 กรัม/ลิตร น้ำตาลกาแล็กโตส 0.36 กรัม/ลิตร และน้ำตาลอะราบิโนส 3.63 กรัม/ลิตร มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.6 กรัม/ลิตร มีปริมาณของสารยับยั้งการเจริญ 2 ชนิด คือ เฟอร์ฟูรัล (furfural) และ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) เท่ากับ 0.09 กรัม/ลิตร และ 0.30 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และมีธาตุอาหาร เช่น แมกนีเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมงกานีส แคลเซียม เหล็ก คอปเปอร์ และสังกะสี เป็นองค์ประกอบในปริมาณเล็กน้อย หลังการปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าทำให้ปริมาณเฟอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล ลดลง 24.84% และ 21.3% ตามลำดับ และมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาล ไนโตรเจนทั้งหมด ธาตุอาหารรอง และโลหะอ่อน ใน 12%-SLH ลดลงอีกด้วย

การศึกษาการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบอ้อยของยีสต์อุดมไขมันทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าทั้งหมดสามารถเจริญและผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบอ้อยได้ โดย *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบอ้อยมากที่สุด มีผลผลิตน้ำมัน (oil yield) สูงที่สุด เท่ากับ 0.98 กรัม/ลิตร จึงเลือกไปหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตไบอ้อย โดยภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 คือ ใช้กล้าเชื้อที่เลี้ยงใน SLH ที่ผ่านการปรับต่างเกินด้วย $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (6% -DSLH) ที่เติมสารสกัดจากเซลล์ยีสต์ 3 กรัม/ลิตร และเพปไทน์ 3 กรัม/ลิตร และผลิตน้ำมันใน 12%-SLH (อัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน เท่ากับ 24) ที่เติม KH_2PO_4 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วัน ที่ภาวะดังกล่าวนี้ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 1.65 กรัม/ลิตร ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ 27.15% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) และอัตราการผลิตน้ำมัน เท่ากับ 0.41 กรัม/ลิตร/วัน ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ที่ผลิตได้เมื่อเจริญในภาวะที่เหมาะสม พบมีกรดโอเลอิก (44.8%) และกรดปาล์มิติก (35.89%) เป็นกรดไขมันองค์ประกอบหลัก และพบมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ใกล้เคียงกับที่พบในน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นน้ำมันจากพืช ที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความหนืด ความถ่วงจำเพาะ เลขซีเทน และเลขไอโอดีนของไบโอดีเซล ที่ทำนายจากปริมาณกรด

ไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 ใกล้เคียงกับของน้ำมันจากยีสต์อุดมไขมันบางสายพันธุ์และน้ำมันพืช อีกทั้งยังมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานไบโอดีเซลของสหรัฐอเมริกา ยุโรป และไทย ดังนั้นน้ำมันยีสต์ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 จึงมีศักยภาพสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซล

นอกจากนั้นในงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาการผลิตน้ำมันและหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2 ในไฮโดรไลเสตไบอ้อย *Cy. subsufficiens* NG8.2 เป็นยีสต์อุดมไขมันที่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่า น้ำมันที่ผลิตมีกรดปาล์มิโตเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันราคาแพง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง พบว่าเมื่อผลิตน้ำมันในภาวะที่เหมาะสม คือ ใน 12%-DSLH ซึ่งเป็นไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ผ่านการปรับต่างเกินด้วย $\text{Ca}(\text{OH})_2$ เพื่อกำจัดฟอสเฟส (อัตราส่วนคาร์บอนต่อฟอสฟอรัส เท่ากับ 21,182) ที่เติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร พีเอช 5.5 และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 4 วัน *Cy. subsufficiens* NG8.2 ให้ผลผลิตน้ำมันและปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.59 กรัม/ลิตร และ 14.86% น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าที่ผลิตใน 12%-SLH คิดเป็น 60.61% และ 51.32% ตามลำดับ ขณะเดียวกันศึกษาปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิกที่ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ผลิตได้ในไฮโดรไลเสตไบอ้อย พบว่าการเติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร ลงใน 12%-DSLH ซึ่งเป็นอาหารไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่เหมาะสมของการผลิตน้ำมันนั้น ทำให้ปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิกที่ผลิตได้เท่ากับ 15.80% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ซึ่งสูงกว่าในน้ำมันที่ผลิตใน 12%-DSLH คิดเป็น 26.91% นอกจากนี้ผลผลิตกรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic yield) ที่ได้ (2.09 มิลลิกรัม/กรัมไบอ้อยแห้ง) ยังสูงกว่าที่ผลิตได้ใน 12%-SLH ที่ผลิตกรดปาล์มิโตเลอิกได้ 1.54 มิลลิกรัม/กรัมไบอ้อยแห้ง แสดงให้เห็นว่า Mg^{2+} มีความสำคัญต่อการผลิตกรดปาล์มิโตเลอิกในน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 ที่ผลิตในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ผ่านการปรับต่างเกินด้วย $\text{Ca}(\text{OH})_2$

บรรณานุกรม

- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1219-1227.
- Akaracharanya A, Kesornsit J, Leepipatpiboon N, Srinorakutara T, Kitpreechavanich V, Tolieng V. 2011. Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology* 61: 431-436.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Am-In S, Yongmanitchai W, Limtong S. 2008. *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from water in a mangrove forest in Ranong province, Thailand. *FEMS Yeast Research* 8: 823-828.
- Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, De Lucia M, Leonardi A, Rossi M. 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial Cell Factories* 9: 73.
- Anamnart S, Tolstorukov I, Kaneko Y, Harashima S. 1998. Fatty acid desaturation in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* strain CBS 1976 and unsaturated fatty acid auxotrophic mutants. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85: 476-482.
- Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M, Guebitz G. 2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology* 99: 3051-3056.
- Araujo F, Hagler A. 2011. *Kluyveromyces aestuarii*, a potential environmental quality indicator yeast for mangroves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 954-958.
- Araujo F, Soares C, Hagler A, Mendonça-Hagler L. 1995. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 68: 91-99.

- Augustyn O, Kock J, Ferreira D. 1992. Differentiation between yeast species, and strains within a species, by cellular fatty acid analysis 5. A feasible technique? *Systematic and Applied Microbiology* 15: 105-115.
- Babij T, Moss F, Ralph B. 1969. Effects of oxygen and glucose levels on lipid composition of yeast *Candida utilis* grown in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering* 11: 593-603.
- Babjeva I, Rheshetova I. 1975. A new yeast species *Candida podzolica* sp. nov. isolated from the soil. *Microbiology* 44: 333-338.
- Balan V. 2019. *Microbial Lipid Production: Methods and Protocols*. Humana, New York.
- Bamdad H, Hawboldt K, MacQuarrie S. 2018. A review on common adsorbents for acid gases removal: focus on biochar. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 81: 1705-1720.
- Bandhu S, Khot MB, Sharma T, Sharma OP, Dasgupta D, Mohapatra S, Hazra S, Khatri OP, Ghosh D. 2018. Single cell oil from oleaginous yeast grown on sugarcane bagasse-derived xylose: an approach toward novel biolubricant for low friction and wear. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 6: 275-283.
- Bao R, Wu X, Liu S, Xie T, Yu C, Lin X. 2018. Efficient conversion of fructose-based biomass into lipids with *Trichosporon fermentans* under phosphate-limited conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 184: 113-123.
- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarra J-L, Molina-Jouve C, Nicaud J-M. 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research* 48: 375-387.
- Beopoulos A, Nicaud JM. 2012. Yeast: a new oil producer? *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 19: 22-28.
- Bhatia SK, Kim J, Song HS, Kim HJ, Jeon JM, Sathiyarayanan G, Yoon JJ, Park K, Kim YG, Yang YH. 2017. Microbial biodiesel production from oil palm biomass hydrolysate using marine *Rhodococcus* sp. YHY01. *Bioresource Technology* 233: 99-109.
- Bobleter O. 1994. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science* 19: 797-841.

- Brandão LR, Vaz AB, Santo LCE, Pimenta RS, Morais PB, Libkind D, Rosa LH, Rosa CA. 2017. Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes. *Fungal Ecology* 28: 33-43.
- Canto A, Herrera CM, Rodriguez R. 2017. Nectar-living yeasts of a tropical host plant community: diversity and effects on community-wide floral nectar traits. *PeerJ* 5: e3517.
- Carrillo W, Carpio C, Morales D, Vilcacundo E, Álvarez M. 2017. Fatty acids composition in macadamia seeds oil (*Macadamia integrifolia*) from Ecuador. *Pharmaceutical and Clinical Research* 10: 303-306.
- Chang YH, Chang KS, Hsu CL, Chuang LT, Chen CY, Huang FY, Jang HD. 2013. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corncob hydrolysate for microbial oil production. *Fuel* 105: 711-717.
- Chaturvedi S, Tiwari R, Bhattacharya A, Nain L, Khare SK. 2019. Production of single cell oil by using cassava peel substrate from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 21: 101308.
- Chen X, Li Z, Zhang X, Hu F, Ryu DD, Bao J. 2009. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159: 591.
- Chen XF, Huang C, Yang XY, Xiong L, Chen XD, Ma LL. 2013. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. *Bioresource Technology* 143: 18-24.
- Chi Z, Zheng Y, Jiang A, Chen S. 2011. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165: 442-453.
- Chi ZM, Liu TT, Chi Z, Liu GL, Wang ZP. 2012. Occurrence and diversity of yeasts in the mangrove ecosystems in Fujian, Guangdong and Hainan provinces of China. *Indian Journal of Microbiology* 52: 346-353.

- Choi S, Ryu DD, Rhee JS. 1982. Production of microbial lipid: effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnology and Bioengineering* 24: 1165-1172.
- ChooChuay C, Pongpiachan S, Tipmanee D, Suttinun O, Deelaman W, Wang Q, Xing L, Li G, Han Y, Palakun J. 2020. Impacts of PM 2.5 sources on variations in particulate chemical compounds in ambient air of Bangkok, Thailand. *Atmospheric Pollution Research* 11: 1657-1667.
- Cryer D, Eccleshall R, Marmur J. 1975. Isolation of yeast DNA. In *Methods in cell biology* (ed. D Prescott), pp. 39-44. Academic press, New York.
- Czabany T, Athenstaedt K, Daum G. 2007. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771: 299-309.
- da Cunha ME, Krause LC, Moraes MSA, Faccini CS, Jacques RA, Almeida SR, Rodrigues MRA, Caramão EB. 2009. Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. *Fuel Processing Technology* 90: 570-575.
- Demirbaş A. 1998. Fuel properties and calculation of higher heating values of vegetable oils. *Fuel* 77: 1117-1120.
- El-Fadaly H, El-Ahmady N, Marvan E. 2009. Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. *Research Journal of Microbiology* 4: 301-313.
- Endoh R, Suzuki M, Benno Y, Futai K. 2008. *Candida kashinagacola* sp. nov., *C. pseudovanderkliftii* sp. nov. and *C. vanderkliftii* sp. nov., three new yeasts from ambrosia beetle-associated sources. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 389-402.
- Endoh R, Suzuki M, Okada G, Takeuchi Y, Futai K. 2011. Fungus symbionts colonizing the galleries of the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. *Microbial Ecology* 62: 106-120.
- Eo MY, Fan H, Cho YJ, Kim SM, Lee SK. 2016. Cellulose membrane as a biomaterial: from hydrolysis to depolymerization with electron beam. *Biomaterials Research* 20: 1-13.
- Evans CT, Ratledge C. 1984. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microbiology* 130: 1693-1704.

- Fell JW. 1961. A new species of *Saccharomyces* isolated from a subtropical estuary. *Antonie van Leeuwenhoek* 27: 27-30.
- Fell JW, Statzell-Tallman A, Scorzetti G, Gutiérrez MH. 2011. Five new species of yeasts from fresh water and marine habitats in the Florida Everglades. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 533-549.
- Fengel D, Wegener G. 2011. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter.
- Festucci-Buselli RA, Otoni WC, Joshi CP. 2007. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 1-13.
- Folch J, Lees M, Stanley GS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.
- Fontanille P, Kumar V, Christophe G, Nouaille R, Larroche C. 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 114: 443-449.
- Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, Franzosi G, Bianchi D, Compagno C. 2012. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology* 111: 398-403.
- Gao Q, Cui Z, Zhang J, Bao J. 2014. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology* 152: 552-556.
- Gao ZL, Gu XH, Cheng FT, Jiang FH. 2003. Effect of sea buckthorn on liver fibrosis: a clinical study. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 9: 1615.
- Garay LA, Boundy-Mills KL, German JB. 2014. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: a mechanistic approach and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 2709-2727.
- Goldberg I. 1985. Organisms and substrates. In *Single Cell Protein* (ed. I Goldberg), pp. 11-66. Springer-Verlag, Berlin.
- Golubev W. 1991. Taxonomic evaluation of mycocins produced by basidiomycetous yeast *Cryptococcus podzolicus*. *Mikrobiologîa (Moskva, 1932)* 60: 115-121.

- Griel AE, Cao Y, Bagshaw DD, Cifelli AM, Holub B, Kris-Etherton PM. 2008. A macadamia nut-rich diet reduces total and LDL-cholesterol in mildly hypercholesterolemic men and women. *Journal of Nutrition* 138: 761-767.
- Grundy S. 2013. Cholesterol: factors determining blood cholesterol levels. *Encyclopedia of Human Nutrition* 1: 335-340.
- Guerzoni M, Lambertini P, Lercker G, Marchetti R. 1985. Technological potential of some starch degrading yeasts. *Starch -Stärke* 37: 52-57.
- Guo X, Cavka A, Jönsson LJ, Hong F. 2013. Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. *Microbial Cell Factories* 12: 1-14.
- Hagler A, De Oliveira R, Hagler LM. 1982. Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek* 48: 53-56.
- Hagler AN, Mendonça-Hagler LC, Pagnocca FC. 2017. Yeasts in aquatic ecotone habitats. In *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity* (eds. P Buzzini, M-A Lachance, A Yurkov), pp. 63-85. Springer, Cham.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Haskell BE, Snell EE. 1965. Effect of vitamin B6 deficiency on the composition of yeast lipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 112: 494-505.
- Hassan M, Blanc PJ, Pareilleux A, Goma G. 1994. Selection of fatty acid auxotrophs from the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* and production of cocoa butter equivalents in batch culture. *Biotechnology Letters* 16: 819-824.
- Hassan M, Blanc PJ, Pareilleux A, Goma G. 1995. Production of cocoa butter equivalents from prickly-pear juice fermentation by an unsaturated fatty acid auxotroph of *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. *Process Biochemistry* 30: 629-634.
- Hayashi N, Togawa K, Yanagisawa M, Hosogi J, Mimura D, Yamamoto Y. 2003. Effect of sunlight exposure and aging on skin surface lipids and urate. *Experimental Dermatology* 12: 13-17.

- Heikal EK, Elmelawy M, Khalil SA, Elbasuny N. 2017. Manufacturing of environment friendly biolubricants from vegetable oils. *Egyptian Journal of Petroleum* 26: 53-59.
- Heinrich U, Neukam K, Tronnier H, Sies H, Stahl W. 2006. Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condition in women. *Journal of Nutrition* 136: 1565-1569.
- Henne WM, Reese ML, Goodman JM. 2018. The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. *EMBO Journal* 37: e98947.
- Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Ceniceros E, Natarajan M. 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 143-169.
- Huang C, Chen X-f, Xiong L, Ma L-l. 2012. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs. *Bioresource Technology* 110: 711-714.
- Huang C, Chen X-f, Xiong L, Yang X-y, Ma L-l, Chen Y. 2013. Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Biomass and Bioenergy* 49: 273-278.
- Huang C, Zong MH, Wu H, Liu QP. 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology* 100: 4535-4538.
- Huang J, Fu S, Gan L. 2019. *Lignin Chemistry and Applications*. Elsevier, Amsterdam.
- Huang X, Wang Y, Liu W, Bao J. 2011. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology* 102: 9705-9709.
- Huang XF, Liu JN, Lu LJ, Peng KM, Yang GX, Liu J. 2016. Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology* 206: 141-149.
- Huang XF, Luo HJ, Mu TS, Shen Y, Yuan M, Liu J. 2018. Enhancement of lipid accumulation by oleaginous yeast through phosphorus limitation under high content of ammonia. *Bioresource Technology* 262: 9-14.

- Iyer PV, Wu Z-W, Kim SB, Lee YY. 1996. Ammonia recycled percolation process for pretreatment of herbaceous biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57: 121.
- Jedvert K, Heinze T. 2017. Cellulose modification and shaping—a review. *Journal of Polymer Engineering* 37: 845-860.
- Jernejc K, Legiša M. 2002. The influence of metal ions on malic enzyme activity and lipid synthesis in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters* 217: 185-190.
- Ji XJ, Huang H, Nie ZK, Qu L, Xu Q, Tsao GT. 2011. Fuels and chemicals from hemicellulose sugars. In *Biotechnology in China III: biofuels and bioenergy* (eds. F-W Bai, C-G Liu, H Huang, GT Tsao), pp. 199-224. Springer, Berlin.
- Jiru TM, Groenewald M, Pohl C, Steyn L, Kiggundu N, Abate D. 2017. Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. *3 Biotech* 7: 145.
- Johnson V, Singh M, Saini V, Sista V, Yadav N. 1992. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 382-384.
- Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 6: 16.
- Jönsson LJ, Martín C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* 199: 103-112.
- Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B. 1998. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49: 691-697.
- Jutakanoke R, Leepipatpiboon N, Tolieng V, Kitpreechavanich V, Srinorakutara T, Akaracharanya A. 2012. Sugarcane leaves: pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy* 39: 283-289.
- Kachalkin A, Glushakova A, Yurkov A, Chernov IY. 2008. Characterization of yeast groupings in the phyllosphere of *Sphagnum* mosses. *Microbiology* 77: 474-481.

- Kates M, Paradis M. 1973. Phospholipid desaturation in *Candida lipolytica* as a function of temperature and growth. *Canadian Journal of Biochemistry* 51: 184-197.
- Kayee J, Sompongchaiyakul P, Sanwlan N, Bureekul S, Wang X, Das R. 2020. Metal concentrations and source apportionment of PM_{2.5} in Chiang Rai and Bangkok, Thailand during a biomass burning season. *ACS Earth and Space Chemistry* 4: 1213-1226.
- Khanal R. 2004. Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 17: 1315-1328.
- Kim TH, Taylor F, Hicks KB. 2008. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresource Technology* 99: 5694-5702.
- Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. 2004. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods* 56: 331-338.
- Kitcha S, Cheirsilp B. 2011. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia* 9: 274-282.
- Kjeldahl C. 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschrift für Analytische Chemie* 22: 366-382.
- Knothe G. 2005. Oxidative stability of biodiesel: literature overview. In *The biodiesel handbook* (eds. G Knothe, J Krahl, J Van Gerpen), pp. 122-126. AOCS, Illinois.
- Knothe G. 2009. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy & Environmental Science* 2: 759-766.
- Knothe G, Matheaus AC, Ryan III TW. 2003. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. *Fuel* 82: 971-975.
- Kolouchová I, Sigler K, Schreiberová O, Masák J, Řezanka T. 2015. New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid. *Bioresource Technology* 192: 726-734.
- Kraisintu P, Yongmanitchai W, Limtong S. 2010. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. *Kasetsart Journal (Natural Sciences)* 44: 436-445.

- Krishnan C, Sousa LdC, Jin M, Chang L, Dale BE, Balan V. 2010. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* 107: 441-450.
- Kunthiphun S, Chokreansukchai P, Hondee P, Tanasupawat S, Savarajara A. 2018. Diversity and characterization of cultivable oleaginous yeasts isolated from mangrove forests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34: 125.
- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. 2011. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the *Saccharomyces* complex determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research* 3: 417-432.
- Kvasnikov E, Nagornaia S, Shchelokova I. 1975. Yeast flora of plant rhizosphere and phyllosphere. *Mikrobiologiya* 44: 339-346.
- Lachance MA, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW, Kurtzman CP. 2011. *Candida* Berkhout (1923). In *The Yeasts: a Taxonomic Study* (eds. C Kurtzman, J Fell, T Boekhout), pp. 987-1278. Elsevier, Amsterdam.
- Lamers D, van Biezen N, Martens D, Peters L, van de Zilver E, Jacobs-van Dreumel N, Wijffels RH, Lokman C. 2016. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnology* 16: 45.
- Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N-O, Jönsson LJ. 1999. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77: 91-103.
- Li M, Liu GL, Chi Z, Chi ZM. 2010. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy* 34: 101-107.
- Li Q, Du W, Liu D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 749-756.

- Li Y, Wu H, Huang C, Zong M. 2011. Using rice straw hydrolysate for microbial oil production by *Trichosporon fermentans* HWZ004. *Chinese Journal of Biotechnology* 27: 1309-1316.
- Li YH, Liu B, Zhao ZB, Bai FW. 2006. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese journal of biotechnology* 22: 650-656.
- Liang K, Zhang Q, Gu M, Cong W. 2013. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology* 25: 311-318.
- Liang Y, Cui Y, Trushenski J, Blackburn JW. 2010. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresource Technology* 101: 7581-7586.
- Liang Y, Tang T, Siddaramu T, Choudhary R, Umagiliyage AL. 2012. Lipid production from sweet sorghum bagasse through yeast fermentation. *Renewable Energy* 40: 130-136.
- Limsuwatthanathamrong M, Sooksai S, Chunhabundit S, Noitung S, Ngamrojanavanich N, Petsom A. 2012. Fatty acid profile and lipid composition of farm-raised and wild-caught sandworms, *Perinereis nuntia*, the diet for marine shrimp broodstock. *Asian Journal of Animal Sciences* 6: 65-75.
- Limtong S, Yongmanitchai W, Kawasaki H, Seki T. 2007. *Candida thaimueangensis* sp. nov., an anamorphic yeast species from estuarine water in a mangrove forest in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 650-653.
- Lin J, Li S, Sun M, Zhang C, Yang W, Zhang Z, Li X, Li S. 2014. Microbial lipid production by oleaginous yeast in d-xylose solution using a two-stage culture mode. *RSC Advances* 4: 34944-34949.
- Lindner P. 1922. Das problem der biologischen fettbildung und fettgewinnung. *Angewandte Chemie* 35: 110-114.
- Liu ZJ, Liu LP, Wen P, Li N, Zong MH, Wu H. 2015. Effects of acetic acid and pH on the growth and lipid accumulation of the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *BioResources* 10: 4152-4166.

- Lottenberg AM, Lavrador MSF, Afonso MS, Machado RM. 2018. Influence of diet on endothelial dysfunction. In *Endothelium and cardiovascular diseases* (eds. P Luz, P Libby, F Laurindo, A Chagas), pp. 341-362. Academic, Massachusetts.
- Lundin H. 1950. Fat synthesis by micro-organisms and its possible applications in industry. *Journal of the Institute of Brewing* 56: 17-28.
- Lyman M, Urbin S, Strout C, Rubinfeld B. 2019. The oleaginous red yeast *Rhodotorula/Rhodospiridium*: a factory for industrial bioproducts. In *Yeasts in biotechnology* (ed. T Basso). IntechOpen, London.
- Machmudah S, Kanda H, Goto M. 2017. Hydrolysis of biopolymers in near-critical and subcritical water. In *Water Extraction of Bioactive Compounds* (eds. H González, M Muñoz), pp. 69-107. Elsevier, Amsterdam.
- Maina S, Pateraki C, Kopsahelis N, Paramithiotis S, Drosinos EH, Papanikolaou S, Koutinas A. 2017. Microbial oil production from various carbon sources by newly isolated oleaginous yeasts. *Engineering in Life Sciences* 17: 333-344.
- Mašínová T, Bahnmann BD, Větrovský T, Tomšovský M, Merunková K, Baldrian P. 2017. Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. *FEMS Microbiology Ecology* 93.
- Matsakas L, Bonturi N, Miranda EA, Rova U, Christakopoulos P. 2015. High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels* 8: 1-6.
- Meesters P, Huijberts G, Eggink G. 1996. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 575-579.
- Middelhoven WJ. 2006. Polysaccharides and phenolic compounds as substrate for yeasts isolated from rotten wood and description of *Cryptococcus fagi* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 90: 57-67.
- Millati R, Niklasson C, Taherzadeh MJ. 2002. Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* 38: 515-522.
- Mitsui T. 1997. *New cosmetic science*. Elsevier, Amsterdam.

- Moodley P, Kana EG. 2019. Bioethanol production from sugarcane leaf waste: effect of various optimized pretreatments and fermentation conditions on process kinetics. *Biotechnology Reports* 22: e00329.
- Moore M, Strom M. 2003. Infection and mortality by the yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* in chinook salmon fed live adult brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Aquaculture* 220: 43-57.
- Morgan NG, Dhayal S. 2010. Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic β -cell. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 82: 231-236.
- Mugica-Álvarez V, Hernández-Rosas F, Magaña-Reyes M, Herrera-Murillo J, Santiago-De La Rosa N, Gutiérrez-Arzaluz M, de Jesús Figueroa-Lara J, González-Cardoso G. 2018. Sugarcane burning emissions: Characterization and emission factors. *Atmospheric Environment* 193: 262-272.
- Munch G, Sestric R, Sparling R, Levin DB, Cicek N. 2015. Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresource Technology* 185: 49-55.
- Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, Nyssönen K, Salonen JT. 2004. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine* 37: 1351-1359.
- Naik B, Kumar V. 2014. Cocoa butter and its alternatives-a review. *Journal of Bioresource Engineering and Technology* 2: 1-11.
- Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, Chambliss CK, Van Walsum GP, Dien BS, Iten LB. 2008. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 624-630.
- Ouellette RJ, Rawn JD. 2015. *Principles of Organic Chemistry*. Academic, Massachusetts.
- Papanikolaou S, Aggelis G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113: 1052-1073.

- Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, Aggelis G, Marc I. 2001. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek* 80: 215-224.
- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I. 2003. Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Current Microbiology* 46: 0124-0130.
- Patel A, Arora N, Sartaj K, Pruthi V, Pruthi PA. 2016. Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 62: 836-855.
- Patel NK, Shah SN. 2015. Biodiesel from plant oils. In *Food, energy, and water* (ed. A Satinder), pp. 277-307. Elsevier.
- Penno A, Hackenbroich G, Thiele C. 2013. Phospholipids and lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831: 589-594.
- Persson P, Andersson J, Gorton L, Larsson S, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. 2002. Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5318-5325.
- Pinzi S, Garcia I, Lopez-Gimenez F, Luque de Castro M, Dorado G, Dorado M. 2009. The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications. *Energy & Fuels* 23: 2325-2341.
- Piskur M. 1939. Review of literature on fats, oils and soaps for 1938. *Oil & Soap* 16: 73-83.
- Poontawee R, Yongmanitchai W, Limtong S. 2017. Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. *Process Biochemistry* 53: 44-60.
- Poontawee R, Yongmanitchai W, Limtong S. 2018. Lipid production from a mixture of sugarcane top hydrolysate and biodiesel-derived crude glycerol by the oleaginous red yeast, *Rhodospiridiobolus fluvialis*. *Process Biochemistry* 66: 150-161.

- Pranimit R, Hoondée P, Tanasupawat S, Savarajara A. 2019. Hydrolysate from phosphate supplemented sugarcane leaves for enhanced oil accumulation in *Candida* sp. NG17. *BioResources* 14: 1014-1032.
- Pumijumnong N. 2014. Mangrove forests in Thailand. In *Mangrove ecosystems of Asia: status, challenges and management strategies* (eds. I Faridah-Hanum, A Latiff, K Hakeem, M Ozturk), pp. 61-79. Springer, New York.
- Qin L, Liu L, Zeng A-P, Wei D. 2017. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology* 245: 1507-1519.
- Ranatunga TD, Jervis J, Helm RF, McMillan JD, Wooley RJ. 2000. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 240-247.
- Ratledge C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807-815.
- Ratledge C, Wynn JP. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* 51: 1-52.
- Ratray J, Schibeci A, Kidby DK. 1975. Lipids of yeasts. *Bacteriological Reviews* 39: 197-231.
- Refaat A. 2009. Correlation between the chemical structure of biodiesel and its physical properties. *International Journal of Environmental Science & Technology* 6: 677-694.
- Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS. 2012. *Standard methods for the examination of water and wastewater 22nd edition*. American Public Health Association, Washington, DC.
- Rodriguez S, Denby CM, Van Vu T, Baidoo EE, Wang G, Keasling JD. 2016. ATP citrate lyase mediated cytosolic acetyl-CoA biosynthesis increases mevalonate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 15: 48.
- Saha BC. 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 279-291.

- Sajjadi B, Raman AAA, Arandiyani H. 2016. A comprehensive review on properties of edible and non-edible vegetable oil-based biodiesel: composition, specifications and prediction models. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 63: 62-92.
- Sanford SD, White JM, Shah PS, Wee C, Valverde MA, Meier GR. 2009. Feedstock and biodiesel characteristics report. *Renewable Energy Group* 416: 1-136.
- Santos CA, Reis A. 2014. Microalgal symbiosis in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 5839-5846.
- Sarin A, Arora R, Singh N, Sarin R, Malhotra R, Sarin S. 2010. Blends of biodiesels synthesized from non-edible and edible oils: effects on the cold filter plugging point. *Energy & Fuels* 24: 1996-2001.
- Saxena V, Sharma C, Bhagat S, Saini V, Adhikari D. 1998. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75: 501-505.
- Schuldiner M, Bohnert M. 2017. A different kind of love—lipid droplet contact sites *Biochimica et Biophysica acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862: 1188-1196.
- Schulze I, Hansen S, Großhans S, Rudszyk T, Ochsenreither K, Syltatk C, Neumann A. 2014. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts—*Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express* 4: 24.
- Serdari A, Lois E, Stournas S. 1999. Impact of esters of mono- and dicarboxylic acids on diesel fuel quality. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 38: 3543-3548.
- Shawky BT, Mahmoud MG, Ghazy EA, Asker MM, Ibrahim GS. 2011. Enzymatic hydrolysis of rice straw and corn stalks for monosugars production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 9: 59-63.
- Shi S, Zhao H. 2017. Metabolic engineering of oleaginous yeasts for production of fuels and chemicals. *Frontiers in Microbiology* 8: 2185.
- Silveira HCS, Schmidt-Carrijo M, Seidel EH, Scapulatempo-Neto C, Longatto-Filho A, Carvalho AL, Reis RMV, Saldiva PHN. 2013. Emissions generated by sugarcane burning promote genotoxicity in rural workers: a case study in Barretos, Brazil. *Environmental Health* 12: 87.

- Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, Levin D, Block DE, German JB, Boundy-Mills KL. 2014. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances* 32: 1336-1360.
- Sitepu IR, Sestric R, Ignatia L, Levin D, German JB, Gillies LA, Almada LA, Boundy-Mills KL. 2013. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource Technology* 144: 360-369.
- Souza RA, Telles TS, Machado W, Hungria M, Tavares Filho J, de Fátima Guimarães M. 2012. Effects of sugarcane harvesting with burning on the chemical and microbiological properties of the soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 155: 1-6.
- Spencer JF, Spencer DM. 2013. *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Springer Science & Business Media.
- Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, Hu Z, Schirmer A, McClure A, Del Cardayre SB, Keasling JD. 2010. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature* 463: 559-562.
- Sundaram V, Muthukumarappan K, Kamireddy SR. 2015. Effect of ammonia fiber expansion (AFEX™) pretreatment on compression behavior of corn stover, prairie cord grass and switchgrass. *Industrial Crops and Products* 74: 45-54.
- Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Shima J. 2014. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource Technology* 153: 230-235.
- Tappi T203 cm-99. 2009. *Alpha-, beta-and gamma-cellulose in pulp, TAPPI test methods*. TAPPI Press, Atlanta.
- Tappi T221 om-02. 2002. *Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525 C*. TAPPI Press, Atlanta.
- Tappi T222 om-15. 2015. *Acid-insoluble lignin in wood and pulp*. TAPPI Press, Atlanta.
- Thanh VN. 2006. *Lipomyces orientalis* sp. nov., a yeast species isolated from soil in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2009-2013.

- Thevenieau F, Nicaud J-M. 2013. Microorganisms as sources of oils. *Oilseeds & fats Crops and Lipids* 20: D603.
- Tsai MH, Lee WC, Kuan WC, Sirisansaneeyakul S, Savarajara A. 2018. Evaluation of different pretreatments of Napier grass for enzymatic saccharification and ethanol production. *Energy Science & Engineering* 6: 683-692.
- Tsai YY, Ohashi T, Wu CC, Bataa D, Misaki R, Limtong S, Fujiyama K. 2019. Delta-9 fatty acid desaturase overexpression enhanced lipid production and oleic acid content in *Rhodosporidium toruloides* for preferable yeast lipid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 127: 430-440.
- Tsigie YA, Wang CY, Kasim NS, Diem QD, Huynh LH, Ho QP, Truong CT, Ju YH. 2012. Oil production from *Yarrowia lipolytica* Po1g using rice bran hydrolysate. *BioMed Research International* 2012.
- Tsigie YA, Wang CY, Truong CT, Ju YH. 2011. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology* 102: 9216-9222.
- Turcotte G, Kosaric N. 1989. Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. In *Bioprocesses and Engineering*, pp. 73-92. Springer.
- Valero E, Millán C, Ortega J. 2001. Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipids in *Saccharomyces cerevisiae* (M330-9) in enological fermentations. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 33-38.
- Van Zyl C, Prior BA, Du Preez JC. 1988. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 17: 357-369.
- Vance D, Vance J. 1996. *Fatty Acid Desaturation and Chain Elongation in Eukaryotes*. Elsevier: Amsterdam.
- Vorapreeda T, Thammarongtham C, Cheevadhanarak S, Laoteng K. 2012. Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology* 158: 217-228.
- Walker GM. 1994. The roles of magnesium in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* 14: 311-354.

- Wang F, Zhang D, Chen M, Yi W, Wang L. 2019. Characteristics of corn stover components pyrolysis at low temperature based on detergent fibers. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7: 188.
- Wang G, Liu L, Liang W. 2018a. Single cell oil production from hydrolysates of inulin by a newly isolated yeast *Papiliotrema laurentii* AM113 for biodiesel making. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 184: 168-181.
- Wang H, Maleky F. 2018. Effects of cocoa butter triacylglycerides and minor compounds on oil migration. *Food Research International* 106: 213-224.
- Wang Q, Guo FJ, Rong YJ, Chi ZM. 2012. Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making. *Renewable Energy* 46: 164-168.
- Wang X, Chi Z, Yue L, Li J, Li M, Wu L. 2007. A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. *Microbiological Research* 162: 77-85.
- Wang Y, Zhang S, Zhu Z, Shen H, Lin X, Jin X, Jiao X, Zhao ZK. 2018b. Systems analysis of phosphate-limitation-induced lipid accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels* 11: 1-15.
- Weeraphan T, Tolieng VT, Kitpreechavanich V, Tanasupawat S, Akaracharanya A. 2016. Sodium hydroxide-steam explosion treated oil palm empty fruit bunch: ethanol production and co-fermentation with cane molasses. *BioResources* 11: 7849-7858.
- Wei Y, Siewers V, Nielsen J. 2017. Cocoa butter-like lipid production ability of non-oleaginous and oleaginous yeasts under nitrogen-limited culture conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 3577-3585.
- Wiebe MG, Koivuranta K, Penttilä M, Ruohonen L. 2012. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnology* 12: 26.
- Williams CM. 2000. Dietary fatty acids and human health. in *Annales de Zootechnie*, pp. 165-180. EDP Sciences.
- Woodbine M. 1959. Microbial fat: microorganisms as potential fat producers. *Progress in Industrial Microbiology* 1: 181-245.

- Wu S, Hu C, Jin G, Zhao X, Zhao ZK. 2010. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology* 101: 6124-6129.
- Wu S, Zhao X, Shen H, Wang Q, Zhao ZK. 2011. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology* 102: 1803-1807.
- Xavier M, Coradini A, Deckmann A, Franco T. 2017. Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochemical Engineering Journal* 118: 11-19.
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M. 2010. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 170-176.
- Xue F, Miao J, Zhang X, Luo H, Tan T. 2008. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology* 99: 5923-5927.
- Yanai H, Tomono Y, Ito K, Furutani N, Yoshida H, Tada N. 2007. Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome. *Nutrition Journal* 6: 43.
- Yang B, Kallio HP. 2001. Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1939-1947.
- Yu X, Zeng J, Zheng Y, Chen S. 2014. Effect of lignocellulose degradation products on microbial biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Process Biochemistry* 49: 457-465.
- Yu X, Zheng Y, Dorgan KM, Chen S. 2011. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology* 102: 6134-6140.
- Yurkov A, Kemler M, Begerow D. 2012a. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology* 5: 24-35.
- Yurkov A, Wehde T, Kahl T, Begerow D. 2012b. Aboveground deadwood deposition supports development of soil yeasts. *Diversity* 4: 453-474.
- Zarringhalami S, Sahari MA, Barzegar M, Hamidi-Esfehani Z. 2012. Production of cocoa butter replacer by dry fractionation, partial hydrogenation, chemical and enzymatic interesterification of tea seed oil. *Food and Nutrition Sciences* 2012.

- Zhang S, Jagtap SS, Deewan A, Rao CV. 2019. pH selectively regulates citric acid and lipid production in *Yarrowia lipolytica* W29 during nitrogen-limited growth on glucose. *Journal of Biotechnology* 290: 10-15.
- Zhao X, Kong X, Hua Y, Feng B, Zhao Z. 2008. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110: 405-412.
- Zheng Y, Guo M, Zhou Q, Liu H. 2019. Effect of lignin degradation product sinapyl alcohol on laccase catalysis during lignin degradation. *Industrial Crops and Products* 139: 111544.
- Zhu L, Zong M, Wu H. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology* 99: 7881-7885.
- Zhu Z, Zhang S, Liu H, Shen H, Lin X, Yang F, Zhou YJ, Jin G, Ye M, Zou H. 2012. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature Communications* 3: 1-12.
- กรมธุรกิจพลังงาน. กำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันดีเซล พ.ศ. 2562. ราชกิจจานุเบกษา 136 (30 มกราคม 2562).
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2556. ฐานข้อมูลศักยภาพชีวมวลในประเทศไทย ประจำปีเพาะปลูก พ.ศ. 2556 ศักยภาพชีวมวลในประเทศไทย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://biomass.dede.go.th/biomass_web/index.html. [16 เมษายน 2563]
- กลุ่มวิชาการและสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย. 2562. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2561/62. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-9040.pdf>. [16 เมษายน 2563]
- กลุ่มส่งเสริมอุตสาหกรรมชีวภาพ. 2562. การใช้ประโยชน์จากอ้อยและผลิตภัณฑ์จากอ้อย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.ocsb.go.th/upload/bioindustry/fileupload/9659-4776.pdf>. [16 เมษายน 2563]
- พุดิตา โขคเทริยญสุชชัย. 2561. การผลิตน้ำมันโดย *Pseudozyma tsukubaensis* จากแป้งมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัชนา พระนิมิตร. 2560. การคัดแยกยีสต์เพื่อผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบอ้อย. วิทยานิพนธ์
ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว YM สูตรดัดแปลงสำหรับการคัดแยกยีสต์

น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
เพปโทน	5	กรัม
สารสกัดจากเซลล์ยีสต์	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3	กรัม
โซเดียมโพรฟิไอเนต	0.25	กรัม
คลอแรมเฟนิคอล	0.001	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
พีเอช	5.5 ± 0.2	

ทำให้ปราศเชื้อโดยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. อาหารเหลวสูตรจำกัดปริมาณไนโตรเจน (nitrogen depleted medium; NDM) (ดัดแปลงจาก Thanh, 2006)

น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.85	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต	0.15	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.1	กรัม
ไฮโดรเจนโบเรต	0.0005	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.00004	กรัม
โพแทสเซียมไอโอดाइด์	0.0001	กรัม
เฟอร์ริกคลอไรด์	0.0002	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.0004	กรัม
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต	0.0002	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.0004	กรัม
คลอแรมเฟนิคอล	0.1	กรัม

น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
พีเอช	5.5 ± 0.2	

ทำให้ปราศเชื้อโดยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. อาหารแข็ง YM

น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
เบคโตเพปโทน	5	กรัม
สารสกัดจากเซลล์ยีสต์	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
พีเอช	5.5 ± 0.2	

ทำให้ปราศเชื้อโดยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. อาหารแข็ง YM สูตรดัดแปลงที่ลดปริมาณไนโตรเจน 20 เท่า

น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
สารสกัดจากเซลล์ยีสต์	0.15	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	0.15	กรัม
เบคโตเพปโทน	0.25	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
พีเอช	5.5 ± 0.2	

ทำให้ปราศเชื้อโดยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. อาหารเหลวผลิตน้ำมัน (oil production medium หรือ OPM)

น้ำตาลกลูโคส	50	กรัม
สารสกัดจากเซลล์ยีสต์	1	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.05	กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.01	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.01	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
พีเอช	5.5 ± 0.2	

ทำให้ปราศเชื้อโดยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. อาหารเหลว Yeast nitrogen base (YNBG) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน

ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
พีเอช	5.5 ± 0.2	

ทำให้ปราศเชื้อโดยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

7. อาหารแข็ง malt extract agar ความเข้มข้น 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (5% MEA)

สารสกัดจากมอลต์	50	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
พีเอช	5.5 ± 0.2	

ทำให้ปราศเชื้อโดยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

8. อาหารแข็ง Corn meal

คอร์นมีล	2	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร

ทำให้ปราศเชื้อโดยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

9. อาหารไฮโดรไลเสตไบอ้อยสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ

สารสกัดเซลล์ยีสต์	3	กรัม
เบคโตเพปโตน	3	กรัม
6%-SLH	1	ลิตร
พีเอช	5.5 ± 0.2	

ทำให้ปราศเชื้อด้วยวิธีการกรอง โดยใช้แผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน



ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต ความเข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (10% SDS)		
โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต	15	กรัม
น้ำปราศจากไอออนปราศจากเชื้อ	150	มิลลิลิตร
2. สารละลายเอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก 0.1 โมลาร์ (EDTA 0.1 M)		
เอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก	11.172	กรัม
ปราศจากไอออน	300	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 ด้วยผลึกโซเดียมไฮดรอกไซด์		
3. สารละลาย Tris ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (Tris 0.5 M)		
ทริส	12.114	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	200	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น		
4. สารละลายไลซิส (Lysis solution)		
สารละลาย 10% SDS	10	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA 0.1 M	60	มิลลิลิตร
สารละลาย Tris 0.5 M	40	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	90	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศเชื้อโดยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. สารละลายโพแทสเซียมอะซีเตท ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์		
โพแทสเซียมอะซีเตท	36.8025	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	150	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.5 ด้วยกรดอะซีติก		
6. สารละลายไนล์เรด ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร		
ไนล์เรด	5	มิลลิกรัม
อะซีโตน	100	มิลลิลิตร
7. สารละลายไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 25%		
ไดเมทิลซัลโฟไซด์	25	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออนปราศจากเชื้อ	75	มิลลิลิตร



ภาคผนวก ค
ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้

ตารางที่ ค.1 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 จังหวัด
จันทบุรี

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
1	WT1.3, WT5.1	<i>Candida (C.) ampicis</i> (AY520327)	99
2	WS7.3, WW3.1	<i>C. pseudolambica</i> (U71063)	99
3	WS7.7. 2, WW 8.2	<i>C. tropicalis</i> (U45749)	100
4	WS2.1, WS3.2, WS6.1, WS7.5, WW2.1	<i>Kluyveromyces (K.) siamensis</i> (U69579)	100
5	WW1.2	<i>Rhodotorula (Rh.) paludigena</i> (AF363640)	100

ตารางที่ ค.2 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีวิจัยพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 4 จังหวัด
ตราด

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
1	BW4.5.2	<i>C. nonsorbophila</i> (AB334209)	100
2	BW8.4	<i>C. orthopsilosis</i> (FJ746056)	99
3	BW9.3	<i>C. thaimueangensis</i> (AB264009)	100
4	BS3.1, BW5.2, BW7.4, BW9.6	<i>C. tropicalis</i> (U45749)	100
5	BS1.1, BS5.1, BS9.3, BW4.5.1, BW6.4, BS8.3	<i>K. siamensis</i> (U69579)	100
6	BW4.1, BW5.4	<i>Kodamaea</i> (Ko.) <i>ohmeri</i> (45702)	100
7	BW5.6	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (U45709)	99
8	BW1.2	<i>Papiliotrema</i> (Pap.) <i>flavescens</i> (AB035042)	100
9	BW6.8	<i>Pichia</i> (P.) <i>chibodasensis</i> (LC126429)	100
10	BW3.3.1, BW3.4, BW6.2	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> (DQ008953)	100
11	BW1.3, BW7.1, BW7.3, BW8.1, BW8.5, BW9.1	<i>Rhodosporidium</i> (R.) <i>paludigena</i> (AF363640)	100
12	BW4.2	<i>Schwanniomyces</i> (Sch.) <i>polymorphus</i> (U45836)	99
13	BW6.1	<i>Candida</i> aff. <i>californica</i> (DQ104729)	98

ตารางที่ ค.3 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 6 จังหวัดเพชรบุรี

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
1	NWB1-1, NWB2-2	<i>C. thaimueangensis</i> (AB264009)	99
2	NWB3-1, NWB7-1	<i>C. tropicalis</i> (U45749)	100
3	NSB6-1, NSB7-1	<i>Debaryomyces (D.) nepalensis</i> (U45839)	99
4	NSB1-2, NSB2-2, NSB9-1, NSB10-1,	<i>K. aestuarii</i> (U69579)	100
5	NSB1-1, NSB2-1, NSB3-1, NSB3-2, NSB6-2, NSB8-1, NWB6-4,	<i>K. siamensis</i> (AB330827)	99
6	NWB2-3	<i>P. anomala</i> (U74592)	99
7	NWB4-1, NWB5-1, NWB6-1	<i>P. kudriavzevii</i> (EF550222)	100
8	NWB2-1	<i>Yamadazyma (Ya.) mexicana</i> (AB499002)	100

ตารางที่ ค.4 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 7 จังหวัดสมุทรสงคราม

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
1	NWK2-3	<i>Ambrosiozyma, monospora</i> (EU011590)	99
2	NSK3-1, NSK12-1, NSK17-3	<i>C. insectorum</i> (U45791)	99
3	NSK3-2, NSK14-1, NWK4- 2	<i>C. thaimueangensis</i> (AB264009)	99
4	NSK5-1, NSK6-1, NSK7-1, NSK15-2, NSK17-1, NWK4-1, NWK5-2	<i>C. tropicalis</i> (U45749)	100
5	NWK8-1	<i>K. siamensis</i> (AB330827)	99
6	NWK2-1	<i>Ya. mexicana</i> (AB499002)	99
7	NSK10-1	<i>Candida</i> aff. <i>ecuadorensis</i> (FR839617)	92
8	NSK9-2, NSK13-2	<i>Candida</i> aff. <i>quercuum</i> (U70184)	93

ตารางที่ ค.5 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จังหวัด
ระนอง

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
1	R11-1.1, R11-3W.4	<i>C. maltose</i> (U45745)	99
2	R11-4.1, R11-7.2	<i>C. pseudolambica</i> (U71063)	99
3	R11-18.2	<i>C. silvanorum</i> (U71068)	100
4	R11-6.1.2	<i>C. thaimueangensis</i> (AB264009)	100
5	R11-17.2	<i>C. tropicalis</i> (U45749)	100
6	R11-14.6	<i>Hannaella phetchabunensis</i> (AB922849)	100
7	R11-2.2, R11-3.1, R11- 6.1.1, R11-3W.2	<i>K. siamensis</i> (U69579)	100
8	R11-12.2, R11-15.7.1	<i>Kwoniella dejecticola</i> (AY917102)	99
9	R11-2.5, R11-2W.4	<i>Metahyphopichia laotica</i> (JX515975)	99
10	R11-1W.1	<i>Naganishia (Nag.) albida</i> (AF075474)	100
11	R11-2W.7	<i>Nag. liquefaciens</i> (AF181515)	100
12	R11-10W.3	<i>Pap. flavescens</i> (AB035042)	100

ตารางที่ ค.5 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
13	R11-1W.1.1, R11-2W.1	<i>Rh. mucilaginos</i> (AF189961)	99
14	R11-14.7, R11-2W.2	<i>Rh. paludigena</i> (AF363640)	100
15	R11-14.4	<i>Rh. sphaerocarpa</i> (AF070425)	99
16	R11-11.3.1, R11-15.5.1	<i>Sai. podzolica</i> (AF444321)	99
17	R11-12.1, R11-14.1, R11-15.3, R11-16.1	<i>Sch. vanriijae</i> var. <i>vanriijia</i> (U45842)	99
18	R11-14.2, R11-15.8	<i>Candida</i> aff. <i>silvanorum</i> (U71068)	85
19	R11-8.2	<i>Goffeauzyma</i> aff. <i>gilvescens</i> (AF181547)	91

ตารางที่ ค.6 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 45 จังหวัดตราด

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
1	MTS1.1.2	<i>C. cylindracea</i> (U45823)	99
2	MTT3.1.4	<i>C. insectorum</i> (U45791)	99
3	MTW8.1	<i>C. pseudolambica</i> (U71063)	99
4	MTW10.4	<i>C. sithepensis</i> (AB120220)	99
5	MTW6.1.1	<i>C. thaimueangensis</i> (AB264009)	100
6	MTT5.1. 2, MTW3.1.2, MTW4.3	<i>C. tropicalis</i> (U45749)	100
7	MTW3.1.3	<i>D. nepalensis</i> (U45839)	99
8	MTS4.4	<i>Ko. ohmeri</i> (U45702)	100
9	MTT4.1	<i>Pap. laurentii</i> (AF410468)	100
10	MTT3.1	<i>P. chibodasensis</i> (LC126429)	100
11	MTW9.2, MTW11.1	<i>Rh. paludigena</i> (AF363640)	100
12	MTW10.1	<i>Sakaçuchia</i> aff. <i>lamellibrachiae</i> (AB263122)	97
13	MTT3.2, MTW10.3	<i>Candida</i> aff. <i>californica</i> (DQ104729)	98

ตารางที่ ค.7 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่สงวนชีวมณฑลระนอง จังหวัดระนอง

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
1	R1-3.1, R1-3W.8, R1-8W.2	<i>C. aaseri</i> (U45802)	99
2	R1-6.9	<i>C. cylindracea</i> (U45823)	99
3	R1-3W.5.3	<i>C. insectorum</i> (U45791)	99
4	R1-12.1, R1-2W.1	<i>C. intermedia</i> (U44809)	99
5	R1-4.3	<i>C. pseudolambica</i> (U71068)	99
6	R1-6.6	<i>C. sorboxylosa</i> (U62314)	99
7	R1-3W.6.3, R1-7W.8, R1-8W.1	<i>C. thaimueangensis</i> (AB264009)	100
8	R1-6.4	<i>C. tropicalis</i> (U45749)	100
9	R1-3.3	<i>K. siamensis</i> (U69579)	100
10	R1-6.3	<i>Ko. ohmeri</i> (U45702)	100
11	R1-3W.1	<i>Pap. laurentii</i> (AF410468)	100
12	R1-7W.2	<i>P. occidentalis</i> (EF550232)	100
13	R1-3W.2	<i>P. sporocuriosa</i> (EF550232)	99
14	R1-4W.1	<i>Rh. paludigena</i> (AF363640)	100
15	R1-1.2	<i>R. toruloides</i> (AF070426)	100
16	R1-5W.5.1	<i>Sait. podzolica</i> (AF444321)	99
17	R1-3W.6.4, R1-5W.5.2	<i>Suhomyces atakaporum</i> (AY309872)	99

ตารางที่ ค.8 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จังหวัดระนอง

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
1	N8.5	<i>C. diversa</i> (U71064)	100
2	N12.5	<i>C. silvanorum</i> (U71068)	100
3	N1.1.1, N12.3, N12.2, N13.3	<i>C. tropicalis</i> (U45749)	100
4	N3.2, N6.2, N8.2.1	<i>C. zeylanoides</i> (U45832)	99
5	N14.1	<i>Pap. flavescens</i> (AB035042)	100
6	N16.2	<i>Pap. laurentii</i> (AF410468)	100
7	N8.7	<i>P. manshurica</i> (EF550223)	100
8	N8.8	<i>P. sporocuriosa</i> (EF550232)	99
9	N7.3.1	<i>P. terricola</i> (EF550233)	99
10	N1.3	<i>R. toruloides</i> (AF070426)	100
11	N8.4, N13.2, N15.3, N16.1, N16.1.2, N2W.7.2	<i>Sait. podzolica</i> (AF444321)	99
12	N5.1.2	<i>Sch. vanrijiae</i> (AB281295.1)	99
13	N1.4	<i>Colacogloea</i> aff. <i>terpenoidalis</i> (AF444729)	98
14	N7.1	<i>Rhodotorula</i> aff. <i>paludigenum</i> (AF363640)	97

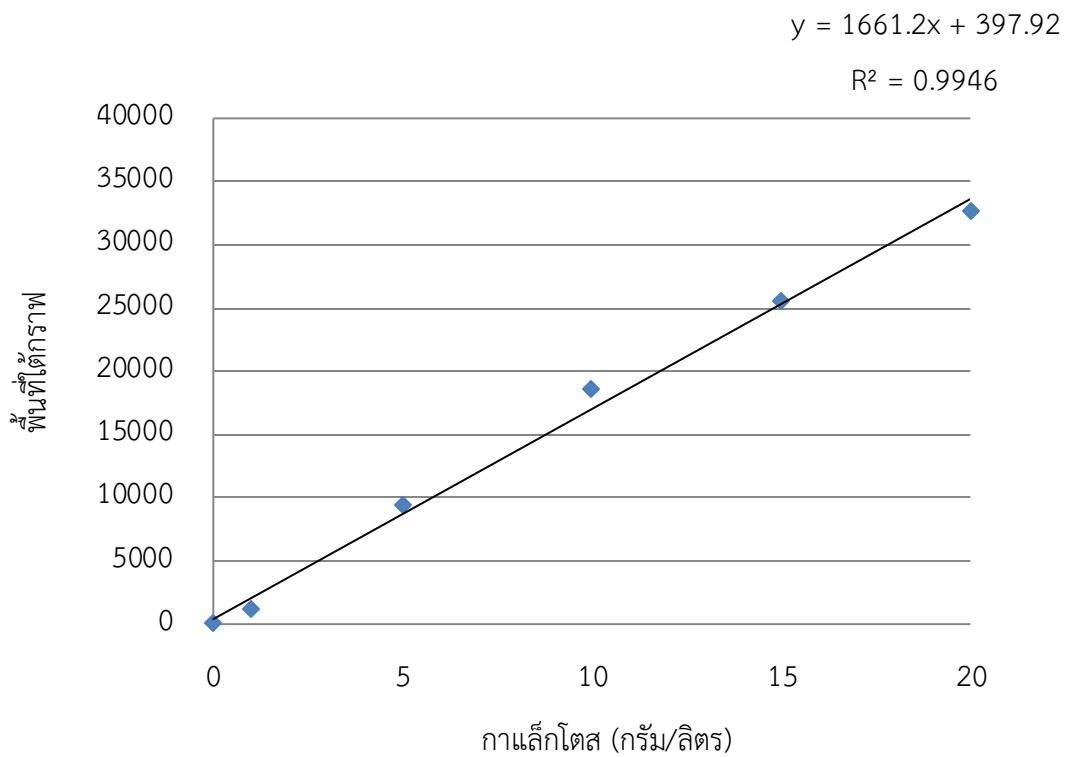
ตารางที่ ค.9 ผลการระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากกวนอุทยานปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์ยีสต์	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (accession number)	ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (%)
1	NSP11-1	<i>C. andamanensis</i> (AB334210)	100
2	NSP16-2, NSP20-1, NSP22-1, NWP2-1, NWP4-1, NWP5-1, NWP7-2, NWP8-1, NWP10-1, NSP11-3, NSP15-2, NSP24-2	<i>C. thaimueangensis</i> (AB264009)	99
3	NSP10-1, NSP23-1	<i>C. tropicalis</i> (U45749)	99
4	NSP22-5	<i>C. viswanathii</i> (U45752)	100
5	NSP1-2, NSP2-1, NSP6-1, NSP8-1, NSP9-1, NSP11- 2, NSP12-1, NSP15-1, NSP16-3, NSP18-1, NSP19-1, NSP20-2, NSP21-1, NSP22-3, NSP24-1, NWP5-2, NWP7-1, NSP14-2	<i>K. siamensis</i> (AB330827)	99
6	NSP10-2	<i>Prototheca</i> aff. <i>wickerhamii</i> (AB183198)	85

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรมของกาแล็กโตส อะราบิโนส และเซลโลไบโอส

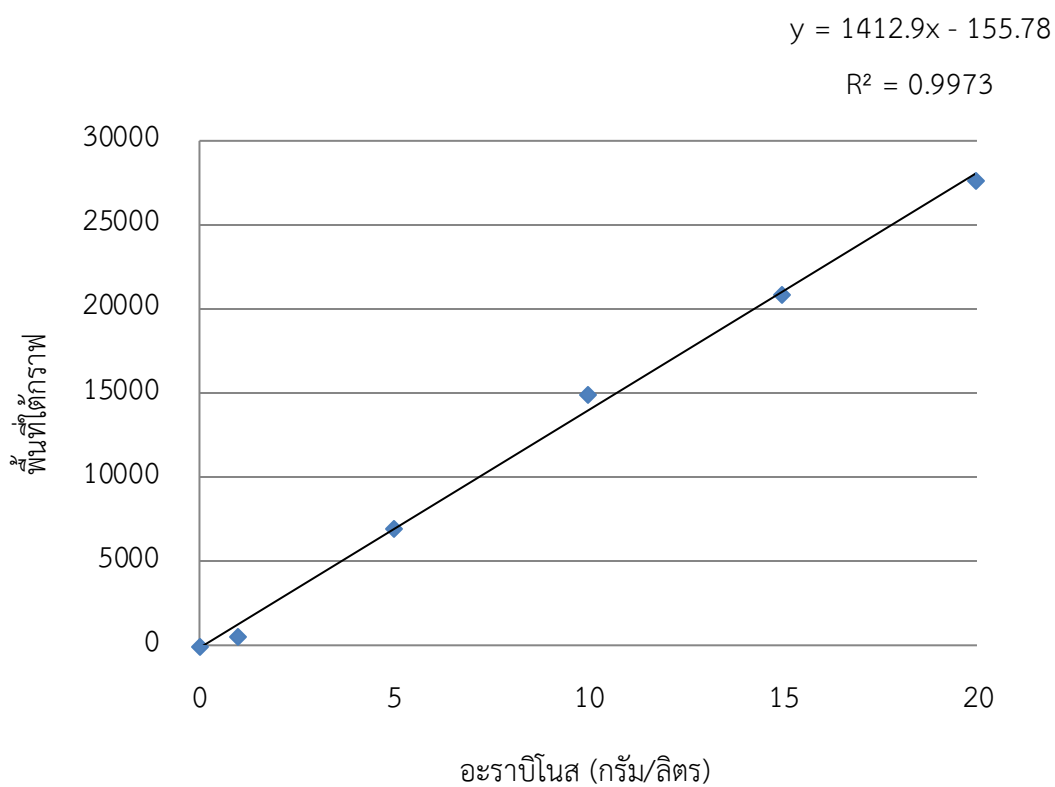
1. กราฟมาตรฐานของอะราบิโนส วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



CHULALONGKORN UNIVERSITY

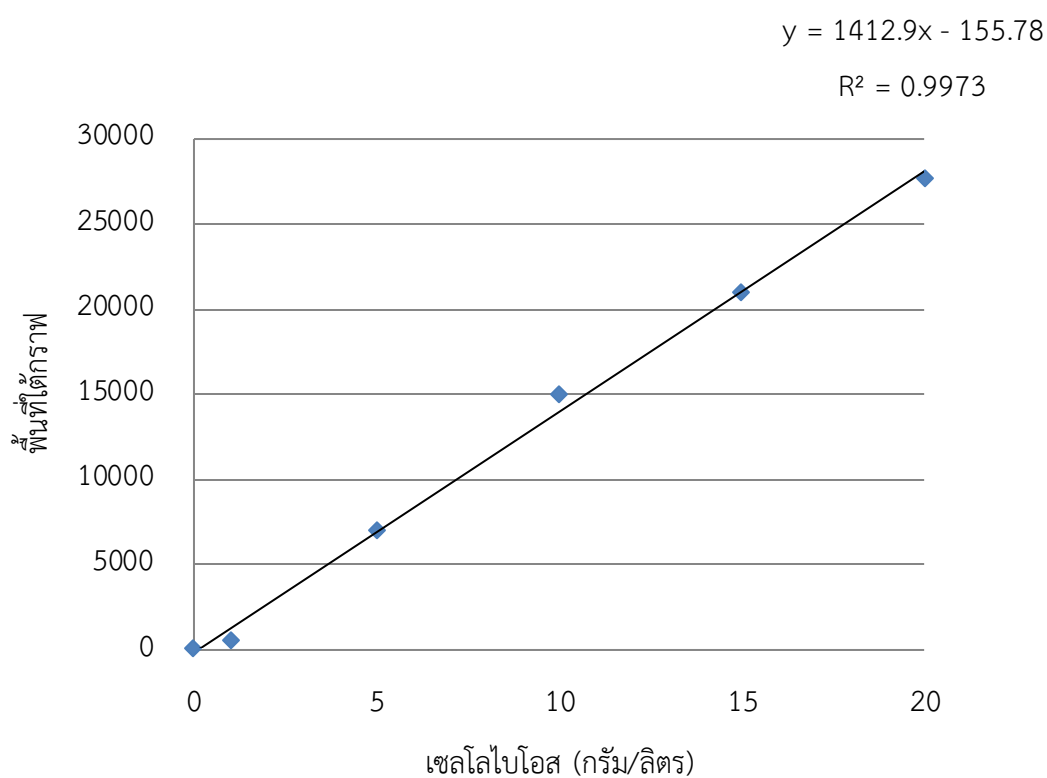
ภาพที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของกาแล็กโตสในช่วงความเข้มข้น 0 - 20 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

2. กราฟมาตรฐานของอะราบิโนส วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



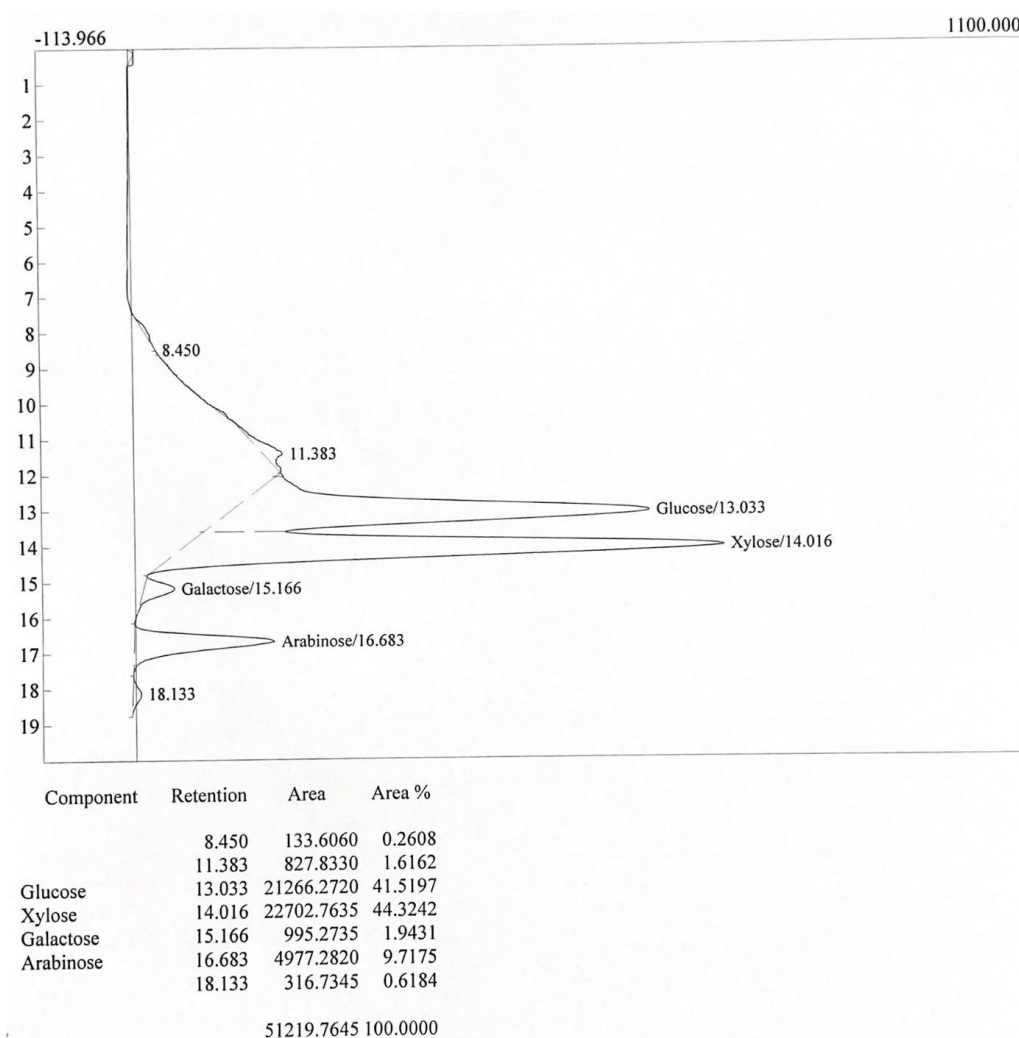
ภาพที่ ง.2 กราฟมาตรฐานของอะราบิโนสในช่วงความเข้มข้น 0 - 20 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

3. กราฟมาตรฐานของเซลโลไบโอส วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



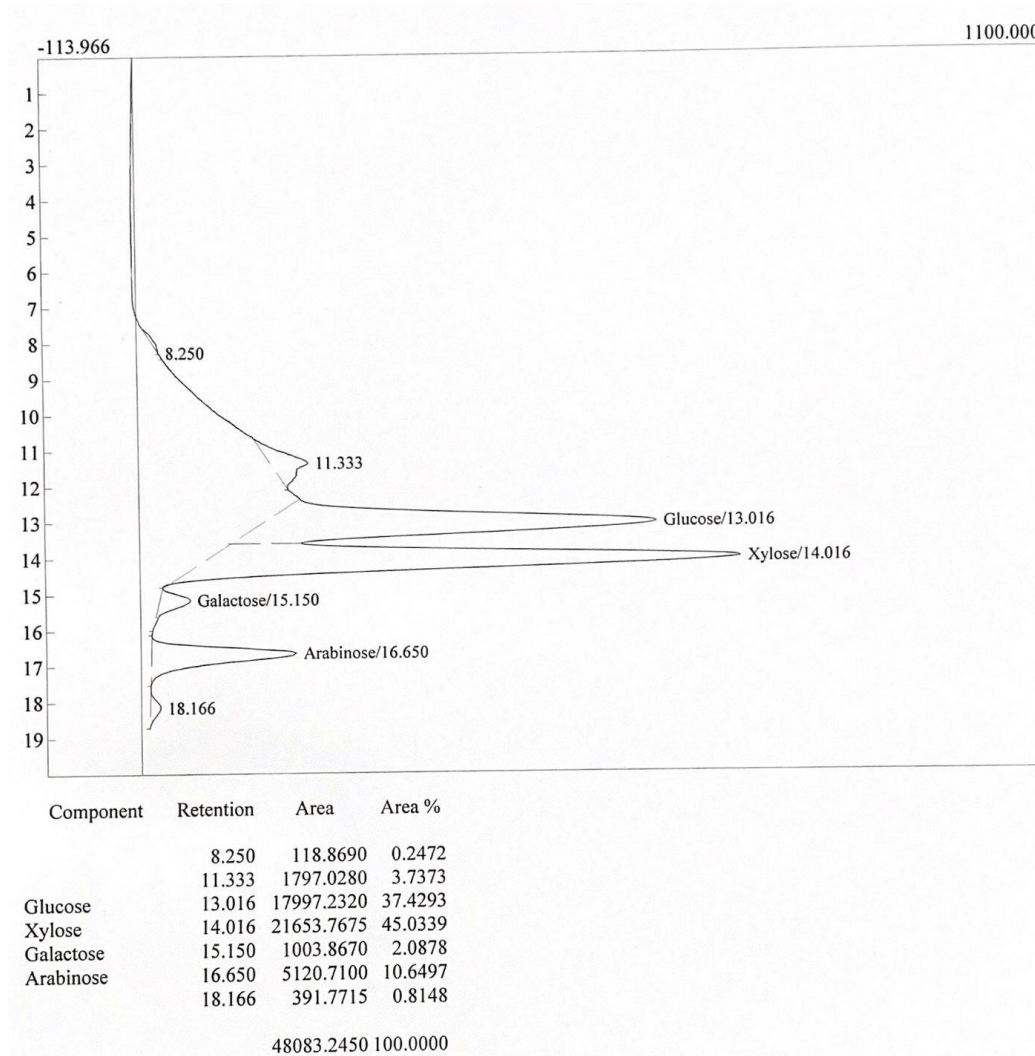
ภาพที่ ง.3 กราฟมาตรฐานของเซลโลไบโอสในช่วงความเข้มข้น 0 - 20 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

4. โครมาโทแกรมของกาแล็กโตส และอะราบินอส ของ 12%-SLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



ภาพที่ ง.4 โครมาโทแกรมของกาแล็กโตส และอะราบินอส ของ 12%-SLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

5. โครมาโทแกรมของกาแล็กโตส และอะราบินอส ของ 12%-DSLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

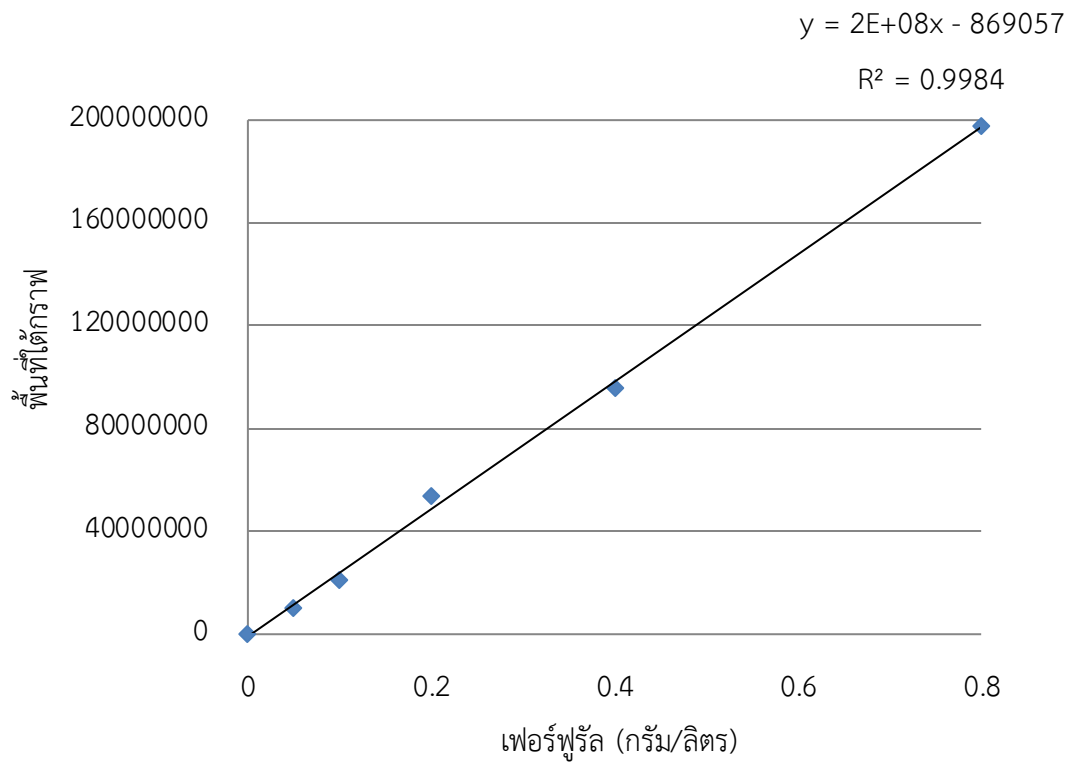


ภาพที่ ง.5 โครมาโทแกรมของกาแล็กโตส และอะราบินอส ของ 12%-DSLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรมของเฟอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF)

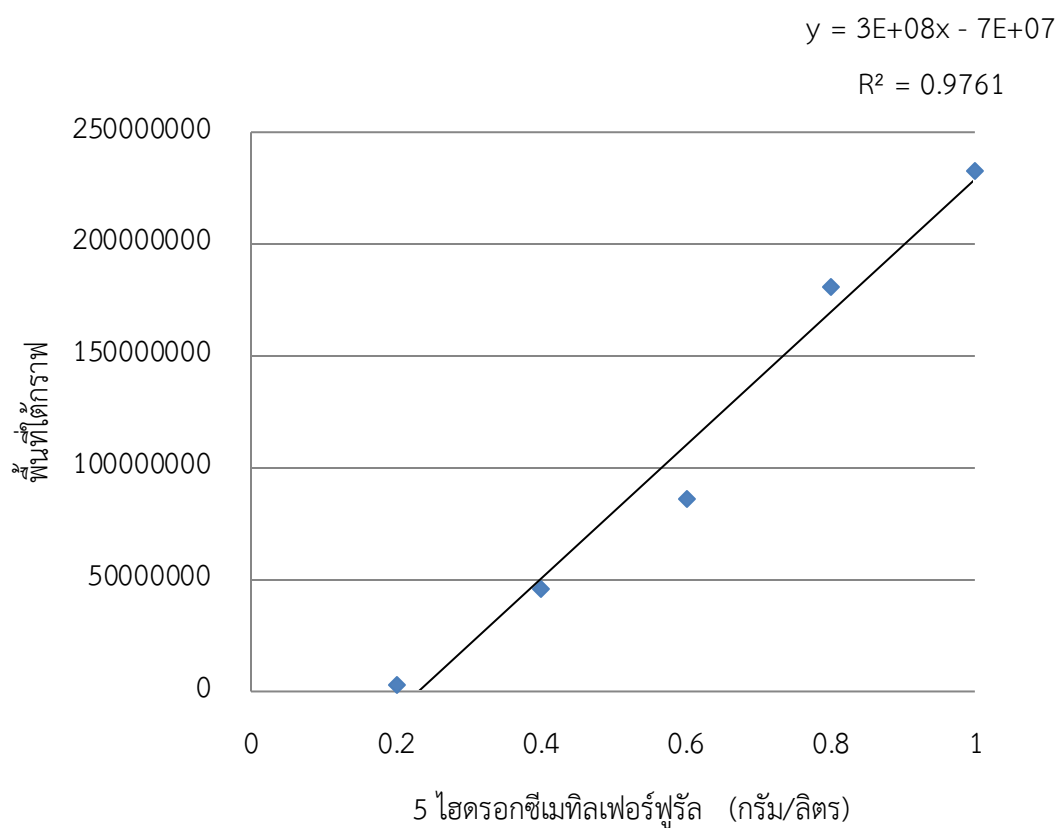
1. กราฟมาตรฐานของเฟอร์ฟูรัล วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



CHULALONGKORN UNIVERSITY

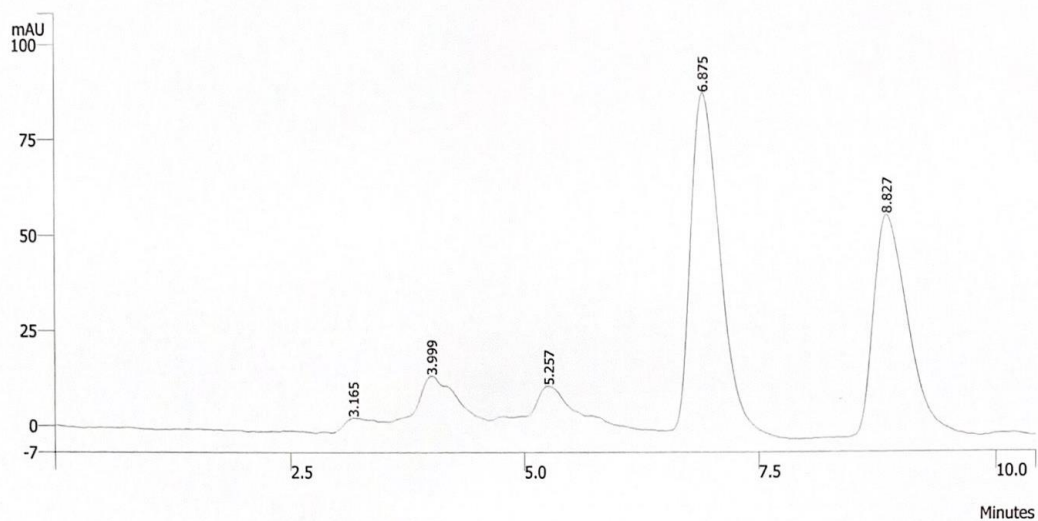
ภาพที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของเฟอร์ฟูรัลที่ช่วงความเข้มข้น 0.05 - 0.8 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

2. กราฟมาตรฐานของ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



ภาพที่ จ.2 กราฟมาตรฐานของ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) ที่ช่วงความเข้มข้น 0.2 – 1.0 กรัม/ลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

3. โครมาโทแกรมของเฟอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) ของ 12%-SLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



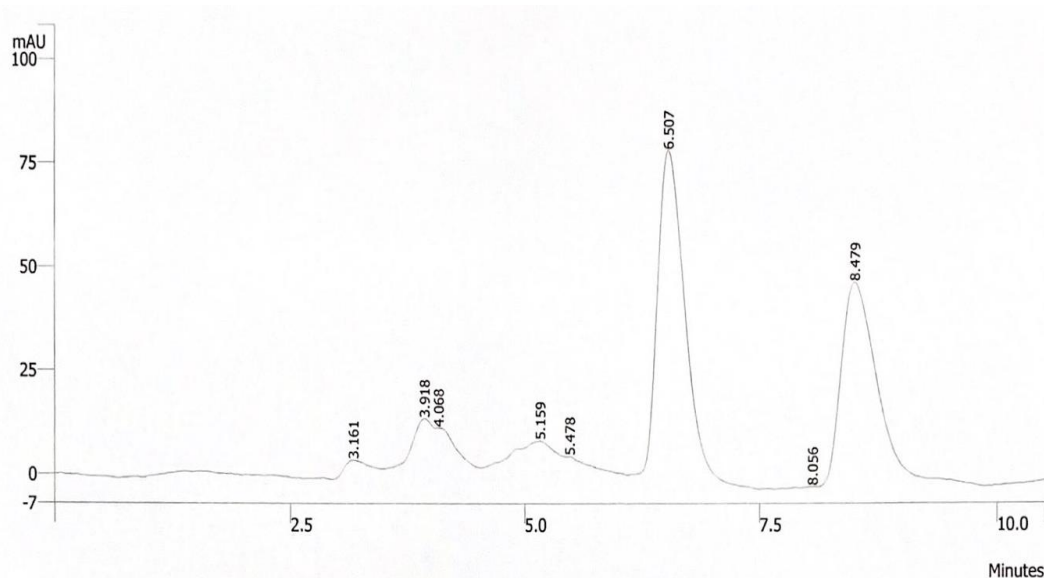
Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code	
1		1.0081	3.165	391653	BB	
2		7.7066	3.999	2994076	BP	
3		4.4946	5.257	1746179	BB	
4		49.0111	6.875	19041274	BB	5HMF
5		37.7797	8.827	14677773	BB	Furfural
Totals		100.0001		38850956		

Status Codes:

U - User defined peak endpoint(s)

ภาพที่ จ.3 โครมาโทแกรมของเฟอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) ของ 12%-SLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

4. โครมาโทแกรมของเฟอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) ของ 12%-DSLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



Peak No	Peak Name	Result (%area)	Ret. Time (min)	Area (counts)	Sep. Code	
1		1.4720	3.161	510292	BB	
2		5.2522	3.918	1820753	BV	
3		4.2450	4.068	1471596	VV	
4		7.0765	5.159	2453174	VV	
5		1.7037	5.478	590602	VB	
6		44.6161	6.507	15466775	BB	5HMF
7		0.2957	8.056	102510	VP	
8		35.3387	8.479	12250627	PB	Furfural
Totals		99.9999		34666328		

Status Codes:

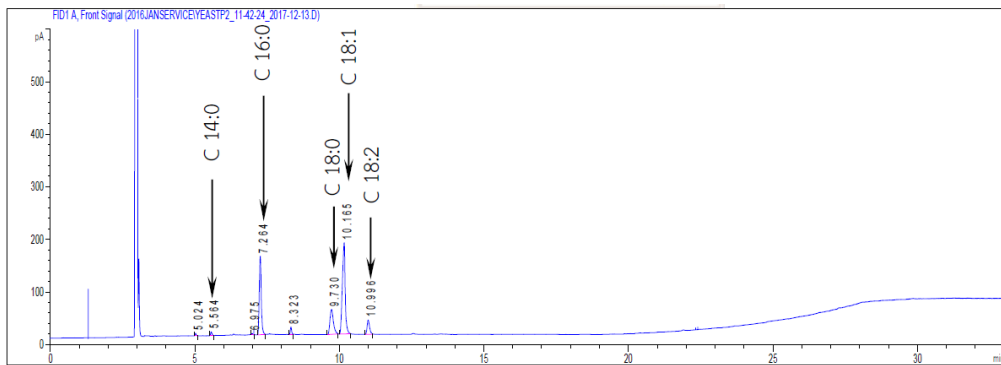
U - User defined peak endpoint(s)

ภาพที่ จ.4 โครมาโทแกรมของเฟอร์ฟูรัลและ 5 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5HMF) ของ 12%-DSLH จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

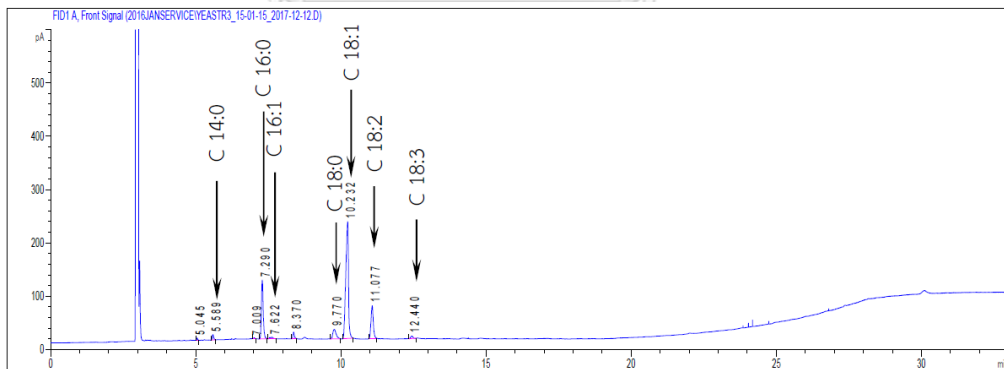
ภาคผนวก ฉ

โครมาโทแกรมของกรดไขมันจากการวิเคราะห์ด้วย GC

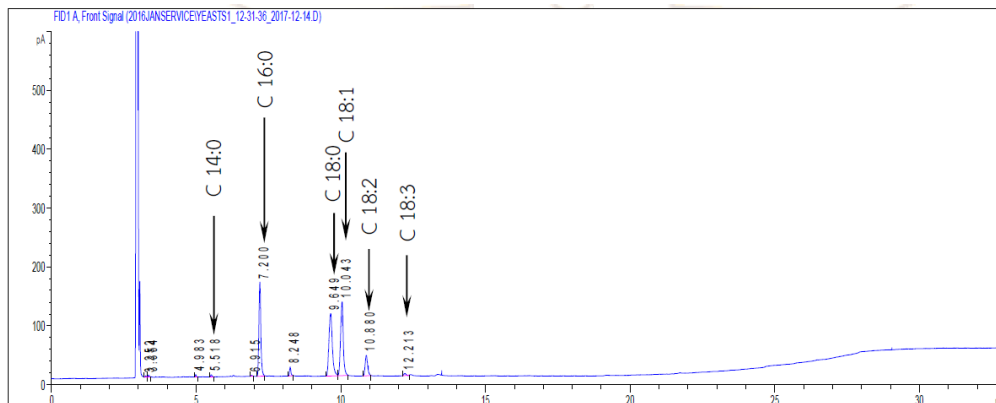
1. โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์อุตสาหกรรม 4 สายพันธุ์ เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน



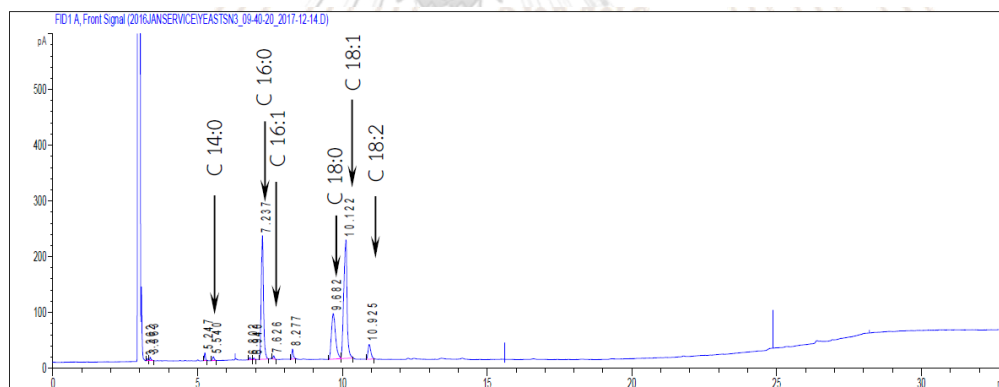
ภาพที่ ฉ.1 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Pap. laurentii* N-16.2 เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน



ภาพที่ ฉ. 2 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน

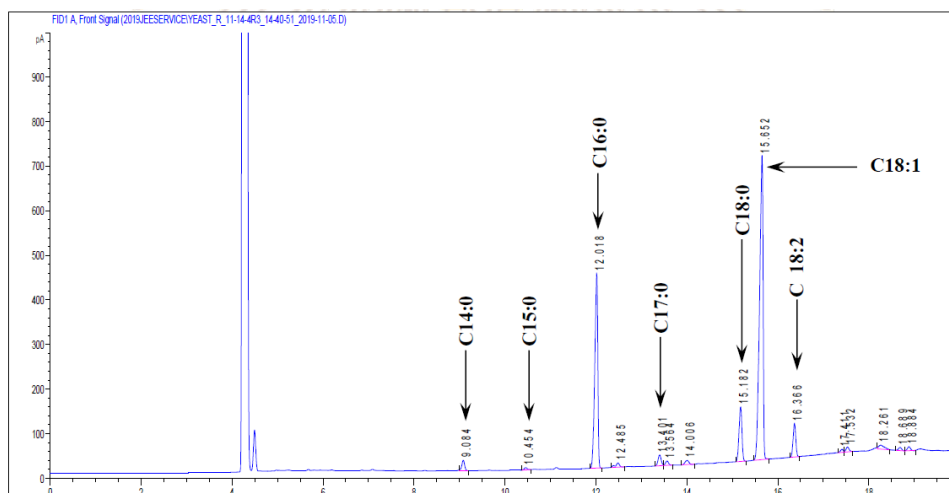


ภาพที่ ฉ.3 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Sait. podzolica* 11-11.3.1 เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน



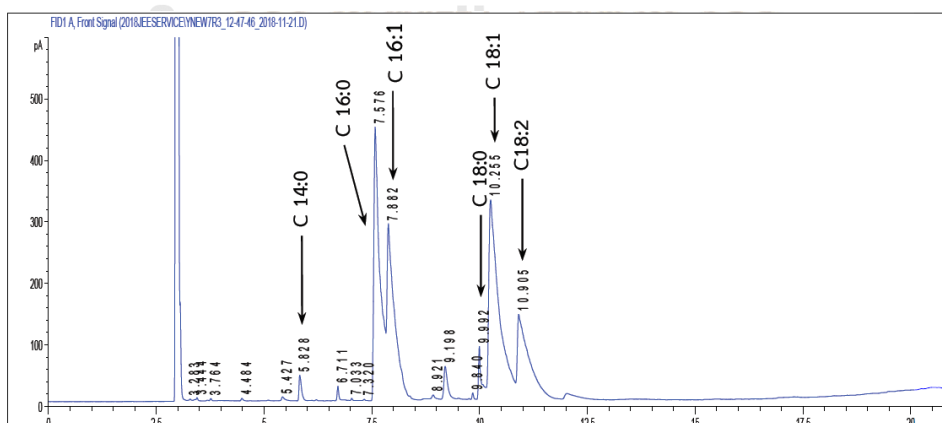
ภาพที่ ฉ.4 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Sait. podzolica* N-8.4 เมื่อเจริญในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน เป็นเวลา 6 วัน

2. โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อเจริญใน 12%-SLH เต็มโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5 เป็นเวลา 4 วัน

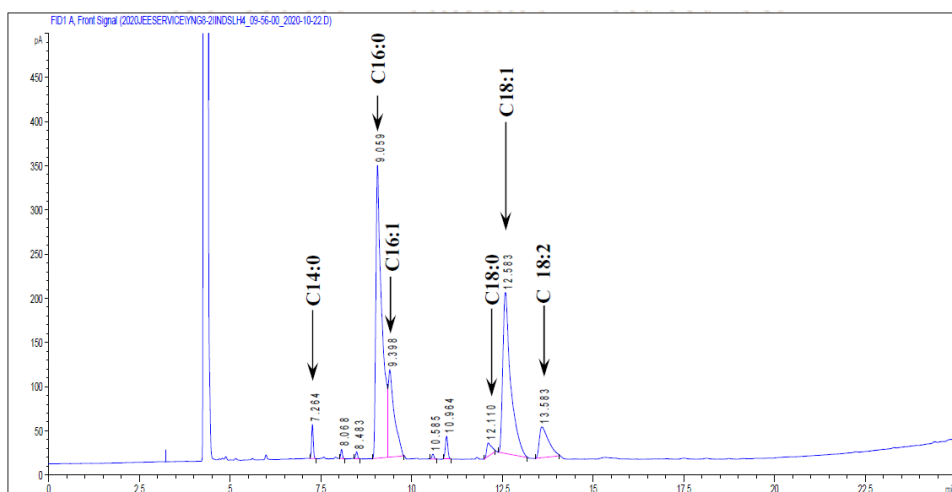


ภาพที่ ๑.5 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Rh. sphaerocarpa* 11-14.4 เมื่อเจริญใน 12%-SLH เต็มโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร พีเอช 4.5 เป็นเวลา 4 วัน

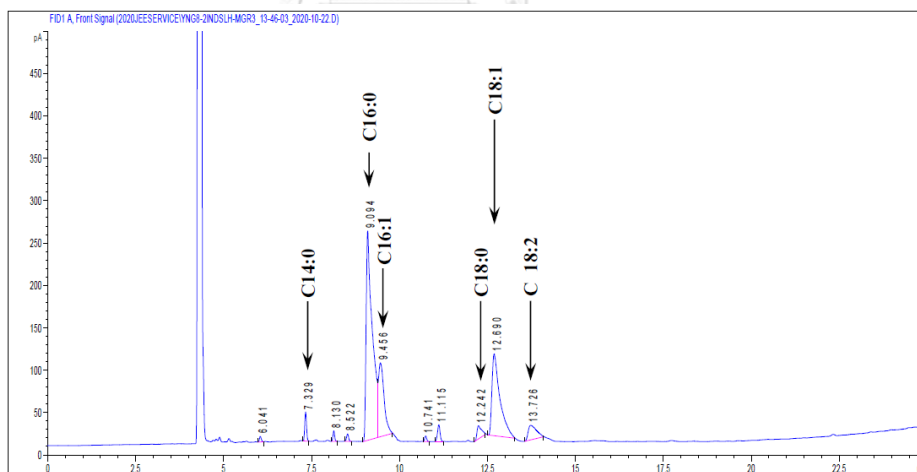
3. โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 เมื่อเจริญในอาหารไฮโดรไลเสตไบอ้อยชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 4 วัน



ภาพที่ ๑.6 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 เมื่อเจริญใน 12%-SLH พีเอช 5.5 เป็นเวลา 4 วัน



ภาพที่ ๗.7 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 เมื่อเจริญใน 12%-DSLH พีเอช 5.5 เป็นเวลา 4 วัน



ภาพที่ ๗.8 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของ *Cy. subsufficiens* NG8.2 เมื่อเจริญใน 12%-DSLH ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต 0.75 กรัม/ลิตรพีเอช 5.5 เป็นเวลา 4 วัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พัชรภรณ์ หุ่นดี
วัน เดือน ปี เกิด	30 กันยายน 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดลำปาง
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2543 – 2545 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนลำปางกัลยาณี จังหวัดลำปาง พ.ศ. 2546 – 2548 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนลำปางกัลยาณี จังหวัดลำปาง พ.ศ. 2549 – 2552 ระดับปริญญาตรี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (เกียรตินิยมอันดับสอง) พ.ศ. 2553 – 2555 ระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2558 – 2563 ระดับปริญญาเอก สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจีโนมิกส์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	41 หมู่ 2 ตำบลวังพร้าว อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง
ผลงานตีพิมพ์	- Hoondee, P., Wattanagonniyom, T., Weeraphan, T., Tanasupawat, S. and Savarajara, A. 2019. Occurrence of oleaginous yeast from mangrove forest in Thailand. World Journal of Microbiology & Biotechnology 35:108. - Hoondee, P., Pranimit, R., Tanasupawat, S. and Savarajara, A. (202x). Evaluation of sugarcane leaves as a substrate for production of palmitoleic acid using <i>Cyberlindnera subsufficiens</i> NG8.2. (ส่งบทความเข้าพิจารณาแล้ว (submitted)) - Hoondee, P., Weeraphan, T., Tanasupawat, S. and Savarajara (Akaracharanya), A. 2018. Screening and characterization of oleaginous yeast for oil production from sugarcane leaves hydrolysate [Proceeding]. The 30th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. November 22-23, 2018 at Ambassador hotel, Bangkok, Thailand.
รางวัลที่ได้รับ	- รางวัลชนะเลิศ ความนิยมนำผลงานวิจัย กลุ่มงานวิจัยเด่น ในการประชุมวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปี 2562 - รางวัลชนะเลิศ ความนิยมนำเสนอ ประเภทการนำเสนอผลงานแบบบรรยาย ในการประชุมวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปี 2562 - Outstanding research in RGJ-University forum from the Royal Golden Jubilee Ph.D. program, the Tawana hotel, Bangkok (24 August 2019)