

การผลิตน้ำมันโดย *Pseudozyma tsukubaensis* จากแป้งมันสำปะหลัง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OIL PRODUCTION BY *Pseudozyma tsukubaensis* FROM CASSAVA STARCH



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตน้ำมันโดย <i>Pseudozyma tsukubaensis</i> จากแป้ง มันสำปะหลัง
โดย	น.ส.พุดิตา โชคเหรียญสุขชัย
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริตา อัครจรัสญา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ (รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวงนิช)
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก (ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริตา อัครจรัสญา)
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)
.....	กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย (รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

พุดิตา โชคเหรียญสุขชัย : การผลิตน้ำมันโดย *Pseudozyma tsukubaensis* จากแป้งมันสำปะหลัง.
(OIL PRODUCTION BY *Pseudozyma tsukubaensis* FROM CASSAVA STARCH) อ.ที่ปรึกษา
หลัก : ศ. ดร.อัญชริตา อัครจรัสญา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ดร.สมบุญ ธนาศุภวัฒน์

คัดกรองได้ยีสต์น้ำมัน *Pseudozyma tsukubaensis* YWT 7-2 จากยีสต์ทั้งหมด 28 สายพันธุ์ที่แยกมาจากป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี ซึ่งสะสมน้ำมันภายในเซลล์ 31.36% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห่งงานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกว่ายีสต์ *P. tsukubaensis* เป็นยีสต์น้ำมัน *P. tsukubaensis* YWT 7-2 สามารถผลิตน้ำมันเมื่อเจริญในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง (high C/N medium) และในสารละลายกลูโคส แสดงว่าการผลิตน้ำมันของยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ในบางครั้งอาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญ แต่ให้ผลผลิตน้ำมันใน high C/N medium มากกว่าในสารละลายกลูโคส *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ผลิตน้ำมันและเพิ่มจำนวนในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (DCSH) ได้มากกว่าในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง (CSH) ปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้เท่ากับ 1.49 กรัม/ลิตร (อัตราการผลิตน้ำมัน 0.75 กรัม/ลิตร/วัน) เมื่อเติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตลงใน DCSH พบว่าผลผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 3.85 กรัม/ลิตร (อัตราการผลิตน้ำมัน 1.28 กรัม/ลิตร/วัน) ที่เอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตน้ำมันคือ 5.5 การเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แทนการเพิ่มจำนวนเซลล์ใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ผลผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 5.42 กรัม/ลิตร (อัตราการผลิตน้ำมัน 1.36 กรัม/ลิตร/วัน) น้ำมันที่ยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ผลิตเมื่อเจริญใน high C/N medium และใน DCSH มีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักเหมือนกัน คือกรดปาล์มติก กรดโอเลอิก กรดสเตียริก และกรดลิโนเลอิก น้ำมันของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ผลิตเป็นไบโอดีเซล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2561	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5972030923 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORD: Oleaginous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, Cassava starch hydrolysate,
Overliming

Puthita Chokreansukchai :
OIL PRODUCTION BY *Pseudozyma tsukubaensis* FROM CASSAVA STARCH. Advisor:
Prof. Ancharida Akaracharanya, Ph.D. Co-advisor: Prof. Somboon Tanasupawat, Ph.D.

Oleaginous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis* YWT7-2, was screened from 28 yeast strains isolated from mangrove forests in Chantaburi province. It had oil content 31.36% w/w, (dry cell weight). This is the first report of *P. tsukubaensis* YWT7-2 as oleaginous yeast. The *P. tsukubaensis* YWT7-2 produced oil when grown in both high carbon/ nitrogen medium and glucose solution. This indicated that cell propagation and oil production of the *P. tsukubaensis* YWT7-2 were temporally separated. However, maximum oil yield in the high carbon/nitrogen medium was higher than glucose solution. Oil content and cell biomass of the *P. tsukubaensis* YWT7-2 grown in cassava starch hydrolysate treated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (DCSH) were higher than cassava starch hydrolysate (CSH). Maximum oil yield in the DCSH was 1.49 g/l (oil productivity 0.75 g/l/d) in the DCSH. Addition of 0.25% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ into the DCSH increased the maximum oil yield to 3.85 g/l (oil productivity 1.28 g/l/d). Optimal pH for oil production was 5.5. Propagation of cell inoculum in DCSH containing 0.2% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.1% (w/v) KH_2PO_4 instead of CSH containing 0.2% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ increased the maximum oil yield to 5.42 g/l (oil productivity 1.36 g/l/d). Oil of *P. tsukubaensis* YWT7-2 produced in the high carbon/nitrogen medium and DCSH had similar major fatty acids composition; palmitic acid, oleic acid, linoleic acid and stearic acid. The *P. tsukubaensis* YWT7-2 oil was suitable as raw material for biodiesel production.

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

Academic Year: 2018
Advisor's Signature
Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงจาก ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ ความช่วยเหลือ กำลังใจ ตลอดจนช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุซาดา จันทร์ประทีป นภธร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ภายนอกมหาวิทยาลัย ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่อนุมัติทุนสนับสนุนงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 1804/15 เพื่อนนิสิต และบุคลากรทุกท่านภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้เสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้ความสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ตลอดที่ศึกษาที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พุดตา โชคเหรียญสุขชัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 แนวคิด ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	5
2.1 ไบโอดีเซล.....	5
2.2 ยีสต์น้ำมัน.....	7
2.3 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์น้ำมัน.....	11
2.3.1 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์ในสภาวะมีไนโตรเจนจำกัด.....	11
2.3.2 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์ในสภาวะที่มีฟอสเฟตเจนนจำกัด.....	14
2.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมัน.....	16
2.4.1 แหล่งไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจน.....	16
2.4.2 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน.....	16
2.4.3 แหล่งคาร์บอน และปริมาณคาร์บอน.....	16

2.4.4 การให้อากาศ.....	17
2.4.5 พีเอช	17
2.4.6 อุณหภูมิ.....	17
2.4.7 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง.....	18
2.4.8 แร่ธาตุ และสารอาหาร	18
2.5 มันสำปะหลัง.....	18
2.5.1 แป้ง(Starch)	21
2.5.2 แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch).....	23
2.5.3 กระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์.....	25
2.5.3.1 การย่อยแป้งครั้งแรก (liquefaction).....	25
2.5.3.2 การย่อยแป้งครั้งสุดท้าย (saccharification).....	25
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	26
3.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในงานวิจัย	26
3.2 เอนไซม์.....	26
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	26
3.4 สารเคมี.....	28
3.5 จุลินทรีย์	29
3.6 วิธีการ.....	29
3.6.1 คัดเลือกยีสต์น้ำมัน	29
3.6.1.1 การตรวจสอบการสะสมไขมันในเซลล์เบื้องต้น	29
3.6.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์.....	29
3.6.2 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ <i>P. tsukubaensis</i> ผลิตและสะสมภายในเซลล์	30
เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผลิตน้ำมันและในสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	30

3.6.3 การเตรียมไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง (ภาพที่ 3-1).....	31
3.6.4 การเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันยีสต์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT 7-2 ใน CSH และ DCSH34	34
3.6.5 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT 7-2.....	34
ใน DCSH	34
3.6.5.1 การศึกษาผลของการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ใน DCSH ต่อการผลิตน้ำมัน	34
3.6.5.2 การศึกษาผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ($NH_4)_2SO_4$ ใน DCSH ต่อการผลิตน้ำมัน	34
3.6.5.3 การศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของ DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตน้ำมัน.....	35
3.6.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของ <i>P. tsukubaensis</i> YWT 7-2.....	35
ซึ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ใน CSH ที่เติม 0.20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	35
3.6.7 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เมื่อเติมร่วมกับ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตใน DCSH ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์.....	36
3.6.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	36
3.6.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันยีสต์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ที่เตรียมได้.....	36
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	37
4.1 ผลการคัดเลือกยีสต์สะสมน้ำมันเบื้องต้น	37
4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์.....	42

4.3 ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ <i>P. tsukubaensis</i> YWT 7-2 ผลิตและสะสม เมื่อ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมันและสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร)44	
4.4 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเมื่อผลิตน้ำมันในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน	45
4.5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง	46
4.6 ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันยีสต์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT 7-2 ใน CSH และ DCSH .	47
4.7 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT 7-2 ใน DCSH.....	50
4.7.1 ผลของการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ลงใน DCSH ต่อการ ...	50
ผลิตน้ำมันของ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2	50
4.7.2 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตใน DCSH ต่อการผลิตน้ำมันของ.....	53
<i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2	53
4.7.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของ DCSH ต่อการผลิตน้ำมัน	56
4.8 ผลของการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ซึ่งเพิ่ม จำนวนเซลล์ใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และใน DCSH ที่ เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	59
4.9 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เมื่อเติมร่วมกับ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตใน DCSH ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์	63
4.10 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเมื่อผลิตน้ำมันใน DCSH.....	66
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	75
บรรณานุกรม.....	76
ภาคผนวก.....	88
ภาคผนวก ก.....	89
ภาคผนวก ข.....	90
ประวัติผู้เขียน.....	91



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2-1 สายพันธุ์ของยีสต์น้ำมัน ปริมาณน้ำมันที่ยีสต์สะสมเมื่อเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ.....	9
ตารางที่ 2-2 องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง.....	20
ตารางที่ 2-3 องค์ประกอบของเนื้อมันสำปะหลัง	20
ตารางที่ 2-4 สมบัติที่สำคัญของอะมิโลส และอะมิโลเพกทิน	23
ตารางที่ 2-5 มาตรฐานของแป้งมันสำปะหลัง.....	24
ตารางที่ 4-1 น้ำมันสะสมในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ผลผลิตน้ำมันของยีสต์จำนวน 8 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้.....	43
ตารางที่ 4-2 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง.....	47
ตารางที่ 4-3 องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์น้ำมันสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ.....	68

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปลดปล่อยมาจากประเทศในกลุ่มองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (OECD) ประเทศนอกกลุ่มองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (Non-OECD) และทั่วโลก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2007 ถึงปี ค.ศ. 2035.....	5
ภาพที่ 2-2 กระบวนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน.....	6
ภาพที่ 2-3 โครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (A) โครงสร้างโมเลกุลของสเตอรอลเอสเทอร์ (B).....	8
ภาพที่ 2-4 ลิพิดพาร์ติเคิลที่สะสมภายในเซลล์ของยีสต์ <i>Cryptococcus curvatus</i>	9
ภาพที่ 2-5 สมการการสังเคราะห์ acetyl-CoA และ oxaloacetic acid	12
ภาพที่ 2-6 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์น้ำมันในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด	13
ภาพที่ 2-7 กระบวนการสังเคราะห์ TAG ผ่านวิถี alpha-glycerol phosphate acylation.....	14
ภาพที่ 2-8 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันในสภาวะที่มีฟอสเฟตจำกัด.....	15
ภาพที่ 2-9 ต้นมันสำปะหลัง.....	19
ภาพที่ 2-10 โครงสร้างอะมิโลส.....	22
ภาพที่ 2-11 โครงสร้างของอะมิโลเพกทิน.....	22
ภาพที่ 2-12 แป้งมันสำปะหลัง.....	24
ภาพที่ 3-1 แผนผังการเตรียมไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง.....	33
ภาพที่ 4-1 แสดงลักษณะหยดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ที่ย้อมติดสีไนโรเรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1000 เท่า.....	37
ภาพที่ 4-2 การเปรียบเทียบ น้ำมันสะสมในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ผลผลิตน้ำมันทั้งหมดของ	45
ภาพที่ 4-3 ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT 7-2 ในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน	46
ภาพที่ 4-5 เปรียบเทียบผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน CSH และ DCSH.....	48

ภาพที่ 4-6 เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน CSH และ DCSH.....	49
ภาพที่ 4-7 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงใน CSH และ DCSH.....	49
ภาพที่ 4-8 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน CSH และ DCSH.....	50
ภาพที่ 4-9 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร).....	52
ภาพที่ 4-10 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร).....	52
ภาพที่ 4-11 น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร DCSH ที่เติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร).....	53
ภาพที่ 4-12 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร).....	53
ภาพที่ 4-13 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	54
ภาพที่ 4-14 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	55
ภาพที่ 4-15 น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงใน DCSH ที่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	55
ภาพที่ 4-16 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	56
ภาพที่ 4-17 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ.....	57
ภาพที่ 4-18 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ.....	57

ภาพที่ 4-19 น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงใน DCSH เต็ม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ.....	58
ภาพที่ 4-20 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยง <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่ เต็ม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ	58
ภาพที่ 4-21 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน CSH ที่เติม 0.2%(น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ หรือ DCSH ที่เติม 0.2%(น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ 0.1%(น้ำหนัก/ปริมาตร) KH_2PO_4 ผลิตน้ำมันใน DCSH เต็ม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	61
ภาพที่ 4-22 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน CSH ที่เติม 0.2%(น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ หรือ DCSH ที่เติม 0.2%(น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ 0.1%(น้ำหนัก/ปริมาตร) KH_2PO_4 ผลิตน้ำมันใน DCSH เต็ม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5	61
ภาพที่ 4-23 น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ที่เพิ่มจำนวนใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ หรือ DCSH ที่เติม 0.2%(น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) KH_2PO_4 ผลิตน้ำมันใน DCSH เต็ม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5.....	62
ภาพที่ 4-24 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน CSH ที่เติม 0.2%(น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ หรือ DCSH ที่เติม 0.2%(น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ 0.1%(น้ำหนัก/ปริมาตร) KH_2PO_4 ผลิตน้ำมันใน DCSH เต็ม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5.....	62
ภาพที่ 4-25 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 ร่วมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผลิตน้ำมันใน DCSH เต็ม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5	64
ภาพที่ 4-26 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 ร่วมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผลิตน้ำมันใน DCSH เต็ม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5	64
ภาพที่ 4-27 น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ <i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 ร่วมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผลิตน้ำมันใน DCSH เต็ม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5	65

ภาพที่ 4-28 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่
 เต็ม KH_2PO_4 ร่วมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผลิตน้ำมันใน DCSH เต็ม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร)
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5..... 65

ภาพที่ 4-29 ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2
 ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับด่างเกิน..... 67



บทที่ 1

บทนำ

1.1 แนวคิด ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน

จากปัญหาโลกร้อนและมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิล ส่งผลให้ต้องหาแหล่งพลังงานอื่นมาทดแทน ไบโอดีเซลหรือเอทิลเอสเทอร์เป็นแหล่งพลังงานที่ผลิตมาจากกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน (trans-esterification) ของไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) กับแอลกอฮอล์ ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่ย่อยสลายได้ง่าย มีสมบัติในการเผาไหม้ใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม สามารถใช้ได้กับเครื่องยนต์ดีเซลที่มีอยู่แล้ว (Sitepu และคณะ, 2014) นอกจากนี้ยังปลดปล่อยแก๊สที่เป็นอันตรายน้อยมาก เช่น แก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และลดการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ถึง 78% เมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงดีเซลแบบดั้งเดิม (Helwani และคณะ, 2009) ระยะเวลาไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันจากพืชอาหาร เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม เป็นต้น แต่จากปัญหาการต้องแบ่งปันกันระหว่างอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมเชื้อเพลิง จึงทำให้มีการพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันของพืชที่ไม่ใช่อาหาร เช่น สับปะรด น้ำมันที่ใช้ในครัวเรือนแล้ว และไขมันจากสัตว์ แต่ปริมาณของน้ำมันเหล่านี้มีไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ไบโอดีเซลทั่วโลก จึงก่อให้เกิดการพัฒนาของการนำน้ำมันจากจุลินทรีย์ ซึ่งเรียกว่า single cell oil (SCO) มาผลิตเป็นไบโอดีเซล (Sitepu และคณะ, 2014)

ยีสต์น้ำมัน (oleaginous yeast) เป็นยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์ได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Ratledge และCohen, 2008) ไขมันที่สะสมส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งกรดไขมันที่ยีสต์น้ำมันสะสม ได้แก่ กรดโอเลอิก กรดสเตียริก กรดปาล์มิติก กรดปาล์มิโตเลอิก กรดไลโนเลอิก กรดไลโนเลนิก ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช (Sitepu และคณะ, 2014) โดยปกติการสะสมน้ำมันในยีสต์น้ำมัน เริ่มจากสารอาหารที่เป็นกุญแจสำคัญถูกจำกัด เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ถูกจำกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอ (Beopoulos และคณะ, 2011) Angerbauer และคณะ (2008) รายงานว่า *Lipomyces starkeyi* ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60 สามารถสะสมน้ำมันได้ 40% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อ

ไนโตรเจนเท่ากับ 150 ความสามารถสะสมน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 68% ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง Kraisintu และคณะ (2010) รายงานว่า *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 140 สามารถสะสมน้ำมันได้ถึง 71.30% ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง Saenge และคณะ (2011) รายงานว่า *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 ซึ่งเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต และ Tween 20 ซึ่งมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 180 สามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้ 41.08% ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง Wu และคณะ (2011) รายงานว่า *Rhodospiridium toruloides* Y4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อซัลเฟอร์เท่ากับ 46,750 สามารถสะสมน้ำมันได้มากถึง 58.3% ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง ข้อดีของการใช้ยีสต์ผลิตน้ำมัน คือ ยีสต์มีอัตราการเจริญที่รวดเร็ว ปริมาณน้ำมันที่ผลิตต่อเซลล์สูง ง่ายต่อการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตส่วนใหญ่อยู่ในรูปไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งคล้ายกับน้ำมันจากพืช (Taskin และคณะ, 2016) นอกจากนั้นการผลิตน้ำมันจากยีสต์ยังมีข้อดีว่าการผลิตน้ำมันจากพืช คือการเพาะเลี้ยงยีสต์ไม่ขึ้นกับฤดูกาล และสภาพภูมิอากาศ นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้หลากหลาย เช่น กลูโคส ไชโลส กลีเซอรอล แป้ง เป็นต้น (Meo และคณะ, 2017)

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการเพาะปลูกมันสำปะหลังมากที่สุด นอกจากนี้ประเทศไทยยังเป็นประเทศที่ส่งออกผลิตภัณฑ์ของมันสำปะหลังรายใหญ่ของโลก (ประภาส ช่างเหล็ก และคณะ, 2560) ในปี 2561/62 ประเทศไทยมีพื้นที่เก็บเกี่ยวมันสำปะหลัง 8.40 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 29.97 ล้านตัน (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562) มันสำปะหลังเป็นพืชที่เพาะปลูกง่าย สามารถปรับตัวได้ดีกับทุกสภาพพื้นที่ ทนต่อโรคพืช แมลง และความแห้งแล้งได้สูงเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น (ประภาส ช่างเหล็ก และคณะ, 2560) องค์ประกอบส่วนใหญ่ในหัวมันสำปะหลังคือ แป้ง 71.9-85.0% (น้ำหนักร/น้ำหนักร) มีโปรตีนประมาณ 1.57-5.78% (น้ำหนักร/น้ำหนักร) (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2560) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตน้ำมัน มันสำปะหลังจะถูกแปรรูปเป็นมันเส้นเพื่อยืดอายุผลผลิต แต่มันเส้นมักมีปัญหาการปนเปื้อนของหิน ดิน ทราาย ที่ทำให้เครื่องจักรเสียหายเมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบของการผลิต แป้งมันสำปะหลังแม้จะมีราคาแพงกว่ามันเส้น แต่พบว่าการใช้มันเส้นและแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ราคาต้นทุนของการผลิตใกล้เคียงกัน เมื่อนับรวมค่าซ่อมบำรุงเครื่องจักรที่เสียหายเนื่องจากหิน ดิน ทราายที่ปนเปื้อนมากับมันเส้น (ธนาพร พลศักดิ์,

2557) Li และคณะ(2010) รายงานว่า *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a ซึ่งเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (batch) ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ประกอบด้วยกลูโคสและมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ประกอบด้วย อะไมโลส 20% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และอะไมโลเพคติน 80%(น้ำหนัก/น้ำหนัก) ด้วยเอนไซม์ สามารถสะสมน้ำมัน 47.9% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ (fed-batch) การสะสมน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 52.9% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง Wang และคณะ (2012) รายงานว่า *Rhodospiridium toruloides* 21167 ซึ่งเพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังในระดับพลาสค์สะสมน้ำมัน 63.2% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักสามารถสะสมน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 63.4% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดกรองยีสต์น้ำมันจากยีสต์ 30 สายพันธุ์ ที่คัดแยกมาจากป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี ซึ่งรวมถึง *P. tsukubaensis* และหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันโดยใช้ไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ และศึกษาสมบัติของน้ำมันที่ผลิตได้

1.2 วัตถุประสงค์

หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันจาก *P. tsukubaensis* โดยใช้ไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

- 1.3.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี
- 1.3.2 เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ *P. tsukubaensis* ผลิตและสะสมในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผลิตน้ำมันและที่แขวนลอยในสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร)
- 1.3.3 หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตและสะสมน้ำมันของ *P. tsukubaensis* จากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง
- 1.3.4 วิเคราะห์ชนิดกรดไขมันในน้ำมันที่ *P. tsukubaensis* ผลิตได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันโดย *P. tsukubaensis* จากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง และทราบองค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้

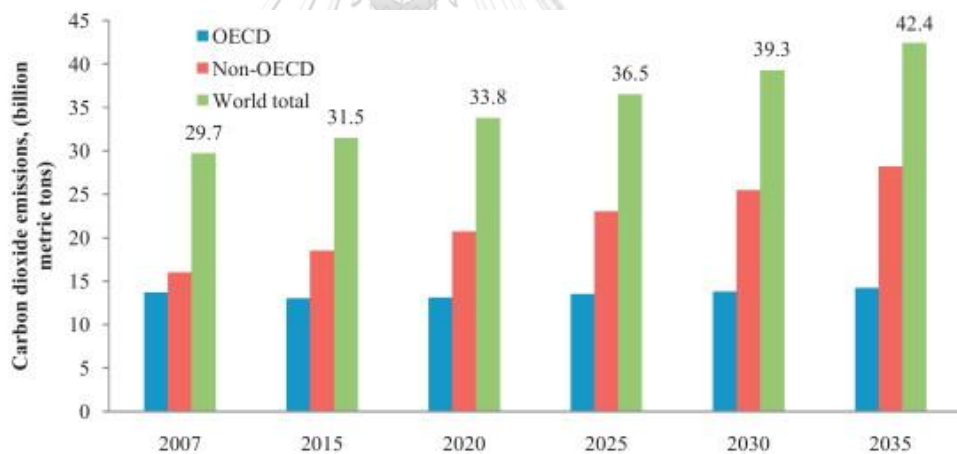


บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ไบโอดีเซล

ทั่วโลกได้ตระหนักถึงปัญหาภาวะโลกร้อนที่เกิดจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิล ซึ่งปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจกที่ประกอบไปด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนใหญ่ (95%) ประมาณการว่าตั้งแต่ปี ค.ศ. 2007 ถึงปี ค.ศ. 2020 มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ถูกปลดปล่อยออกมาสู่บรรยากาศประมาณ 4.1 พันล้านตัน และตั้งแต่ปี ค.ศ. 2020 ถึงปี ค.ศ. 2035 จะมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ถูกปลดปล่อยออกมาอีก 8.6 พันล้านตัน ดังแสดงในภาพที่ 2-1 ส่งผลให้นักวิจัยจำนวนมากทำการสำรวจหาแหล่งพลังงานอื่นมาทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล (Atabani และคณะ, 2012)



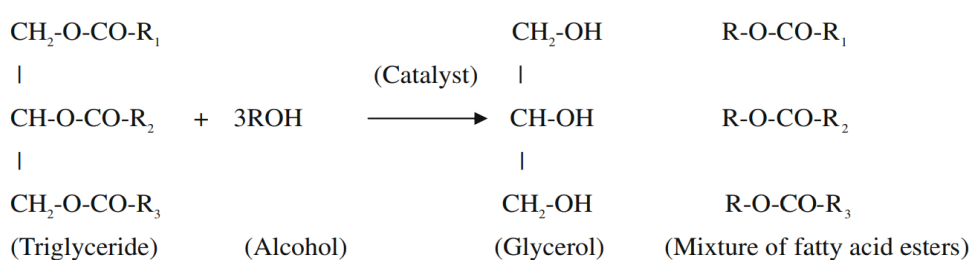
OECD (Organization for Economic Cooperation and Development): กลุ่มองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ

Non-OECD (Countries outside the Organization for Economic Cooperation and Development): ประเทศนอกกลุ่มองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ

ภาพที่ 2-1 ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปลดปล่อยมาจากประเทศในกลุ่มองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (OECD) ประเทศนอกกลุ่มองค์การเพื่อความร่วมมือและการพัฒนาทางเศรษฐกิจ (Non-OECD) และทั่วโลก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2007 ถึงปี ค.ศ. 2035

(Atabani และคณะ, 2012)

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงทดแทน ย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ ไม่มีพิษ และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย (Demirbas, 2009) ไบโอดีเซลผลิตได้จากการนำไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอไรด์มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันกับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอล หรือเอทานอล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เป็นแอลคิลเอสเทอร์ (alkyl esters) (Leung และคณะ, 2010; Patel และคณะ, 2017) ดังสมการ



ภาพที่ 2-2 กระบวนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน
(Leung และคณะ, 2010)

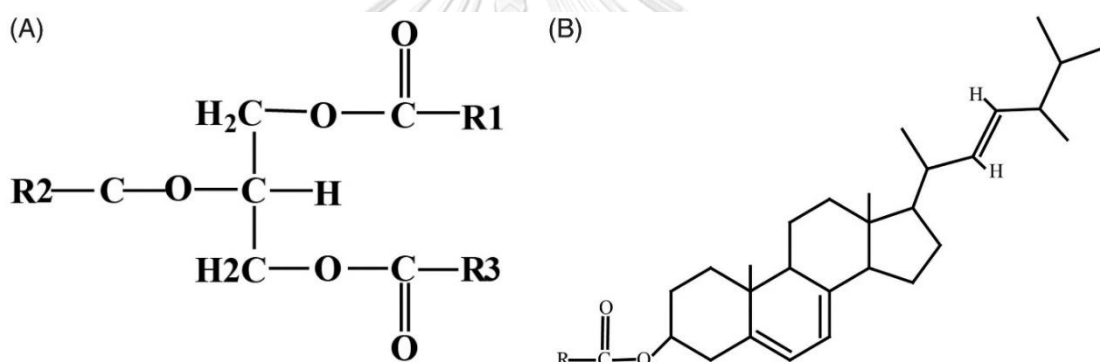
ไบโอดีเซลสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลแบบดั้งเดิมได้ ปลอดภัยแก่สคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ ไม่มีกำมะถัน และสารประกอบอะโรมาติก ทำให้ไบโอดีเซลเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Patel และคณะ, 2017) แหล่งไขมันที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ และน้ำมันที่ใช้แล้วจากครัวเรือน (Demirbas, 2009) แต่การเพาะปลูกพืชน้ำมันมีข้อจำกัดเรื่องพื้นที่เพาะปลูก สภาพภูมิอากาศ และฤดูกาล นอกจากนี้การใช้พืชน้ำมันจำนวนมากในการผลิตไบโอดีเซลนำไปสู่การขาดแคลนน้ำมันสำหรับบริโภค และการเพิ่มขึ้นของราคาอาหาร (Koutinas และPapanikolaou, 2011) ประกอบกับน้ำมันที่ได้จากแหล่งอาหารไม่สามารถเต็มเต็มความต้องการการผลิตไบโอดีเซลระดับใหญ่ได้ จึงจำเป็นต้องหาแหล่งวัตถุดิบที่ไม่ใช่พืชอาหารมาทดแทน (Sawangkeaw และ Ngamprasertsith, 2013) การใช้ไขมันสัตว์ น้ำมันที่ใช้แล้วจากครัวเรือน และน้ำมันจากพืชที่ไม่ใช่อาหาร ช่วยลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลได้ แต่วัตถุดิบเหล่านี้มีไม่เพียงพอต่อความต้องการนำไปผลิตเป็นเชื้อเพลิงไบโอดีเซลสำหรับทั่วโลก (Patel และคณะ, 2017) การใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตน้ำมันมีข้อดีมากมาย เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งน้ำมันอื่น ๆ เช่น ใช้ระยะเวลาในการเจริญที่สั้น อัตราการผลิตไขมันสูง และการผลิตไขมันไม่ขึ้นกับฤดูกาล และสภาพอากาศ (Huang และคณะ, 2013) ไขมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย รา และสาหร่าย เรียกว่า single cell oil (SCO) สามารถ

ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลได้ เนื่องจากองค์ประกอบของกรดไขมันมีลักษณะใกล้เคียงกับน้ำมันพืช (Patel และคณะ, 2017)

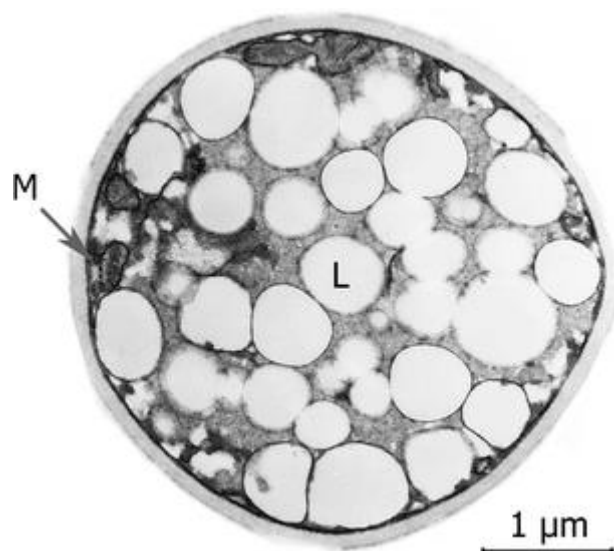
2.2 ยีสต์น้ำมัน

ยีสต์น้ำมัน เป็นยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Ageitos และคณะ, 2011) น้ำมันส่วนใหญ่ประกอบด้วย ไตรเอซิลกลีเซอรอล 80-90% มีสเตอรอล เอสเทอร์ (sterol esters) เพียงเล็กน้อย (Xue และคณะ, 2018) แสดงถึงภาพที่ 2-3 ซึ่งสะสมอยู่ในรูปลิพิดพาร์ติเคิล (lipid particle) ภายในเซลล์ยีสต์ (Wang และคณะ 2015) ดังภาพที่ 2-4 น้ำมันที่ยีสต์ผลิตมีองค์ประกอบใกล้เคียงกับที่พบในน้ำมันพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซล (Evans และ Ratledge, 1984) แต่อย่างไรก็ตามชนิดของกรดไขมัน และปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของยีสต์ (Beopoulos และคณะ, 2009) ยีสต์น้ำมันที่พบโดยทั่วไปอยู่ในยีสต์ *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* และ *Yarrowia* (Ageitos และคณะ, 2011) เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์น้ำมันอื่นๆ ได้แก่ จุลสาหร่ายบางชนิด และเชื้อรา ยีสต์น้ำมันมีข้อดี คือ ใช้เวลาในการแบ่งตัวสั้นกว่า (น้อยกว่า 1 ชั่วโมง) มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ให้จำนวนเซลล์สูง ให้ปริมาณน้ำมันที่สูงกว่าจุลสาหร่าย ง่ายต่อการขยายขนาด การเพาะเลี้ยง (Li และคณะ, 2008; Xue และคณะ, 2018) การเพาะเลี้ยงไม่ขึ้นกับฤดูกาลและสภาพอากาศ (Santos และReis, 2014) สามารถทำได้ในถังหมักแบบปกติ (Sawangkeaw และ Ngamprasertsith, 2013) ทนต่อความเข้มข้นสูงของไอออนโลหะได้มากกว่าเชื้อรา ต้องการออกซิเจนต่ำกว่าเชื้อรา และเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียน้ำมัน เซลล์ยีสต์มีขนาดใหญ่กว่า จึงง่ายต่อการเก็บเซลล์ (Santos และReis, 2014) ยีสต์เจริญได้ดีที่พีเอชต่ำจึงสามารถควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ (Sitepu และคณะ, 2014) และเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่าแบคทีเรีย (Lamers และคณะ, 2016) ยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายสำหรับการเจริญและผลิตน้ำมัน เช่น กลูโคส ไซโลส กากน้ำตาล กลีเซอรอล ไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง ของเสียอินทรีย์จากโรงงานอุตสาหกรรม และไฮโดรไลเสตของลิกโนเซลลูโลส เป็นต้น (Poontawee และคณะ, 2017) นอกจากนั้นการเติมสารประกอบบางชนิดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำมันหอมระเหย (Moustogianni และคณะ, 2015) โซเดียมคลอไรด์ (Tchakouteu และคณะ, 2017) ทำให้สามารถผลิตน้ำมันของยีสต์ได้ในสภาวะที่ไม่ต้องทำให้ปราศจากเชื้อเป็นการลดต้นทุนการผลิต มีรายงานว่

ยีสต์ *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 สะสมน้ำมัน 44-54% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Papanikolaou และ Aggelis, 2002; Papanikolaou และคณะ, 2002) ยีสต์สีแดง เช่น *R. mucilaginosa* TJY15a ที่แยกได้จากผิวของปลาทะเล เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบตช์สะสมน้ำมัน 47.9% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์สะสมน้ำมัน 52.9% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Li และคณะ, 2010) *R. toruloides* 2F5 ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหารที่มีอินูลินเป็นแหล่งคาร์บอน ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 15.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งสะสมน้ำมัน 70.36% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง *R. toruloides* 21167 ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 80% เป็นเวลา 192 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 22 กรัมต่อลิตร ที่สะสมน้ำมัน 63.4% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Wang และคณะ, 2012) สายพันธุ์ของยีสต์น้ำมัน ปริมาณน้ำมันที่สะสมเมื่อเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2-1



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (A) โครงสร้างโมเลกุลของสเตอรอลเอสเทอร์ (B) (Xue และคณะ, 2018)



ภาพที่ 2-4 ลิพิดพาร์ติเคิลที่สะสมภายในเซลล์ของยีสต์ *Cryptococcus curvatus*

M : ไมโทคอนเดรีย L: ลิพิดพาร์ติเคิล (Holdsworth และคณะ, 1988)

ตารางที่ 2-1 สายพันธุ์ของยีสต์น้ำมัน ปริมาณน้ำมันที่ยีสต์สะสมเมื่อเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

ยีสต์น้ำมัน	น้ำมันสะสม (% น้ำมันต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอน	อ้างอิง
<i>Aureobasidium melanogenum</i> P10	66.3	กลูโคส	Wang และคณะ, 2014
<i>A. melanogenum</i> P5	32.5	กลูโคส	Liu และคณะ, 2014
<i>A. melanogenum</i> 9-1 88	43.0	อินูลิน	Xin และคณะ, 2017
<i>Lipomyces starkeyi</i>	61.5	กลูโคส + ไซโลส	Zhao และคณะ, 2008
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	48.0	กลูโคส	Li และคณะ, 2007

ยีสต์น้ำมัน	น้ำมันสะสม (% น้ำมันต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอน	อ้างอิง
<i>R. toruloides</i> 2F5	70.4	อินูลิน	Wang และคณะ, 2014
<i>R. toruloides</i> 21167	63.4	แป้งมัน สำปะหลัง	Wang และคณะ, 2012
<i>R. sphaerocarpum</i>	74.1	กลูโคส	Garay และคณะ, 2016
<i>R. babjevae</i>	62.4	กลูโคส	Garay และคณะ, 2016
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> TJY15a	47.9	แป้งมัน สำปะหลัง	Li และคณะ, 2010
<i>R. colostri</i>	62.9	กลูโคส	Garay และคณะ, 2016
<i>Trichosporon cutaneum</i> AS 2.571	65.6	กลูโคส	Li และคณะ, 2008
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 50109	44.0	ไขมันสัตว์	Papanikolaou และคณะ, 2002
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 50109 M25	48.7	กลูโคส	Wang และคณะ, 2013
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 50109 PA56	49.6	กลูโคส	Wang และคณะ. 2015
<i>Y. lipolytica</i> LGAMS(7)1	40.0	สเตียอริน + กลีเซอรอล	Papanikolaou และ Aggelis, 2002

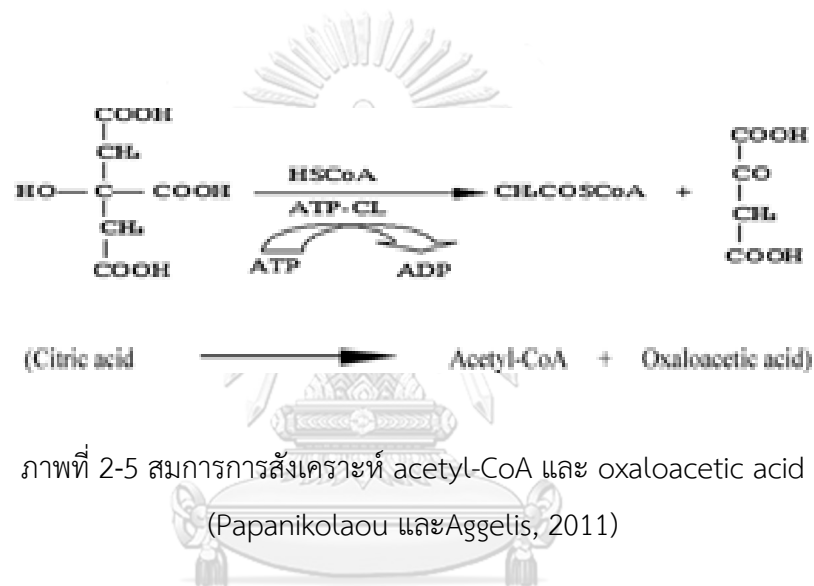
ยีสต์น้ำมัน	น้ำมันสะสม (% น้ำมันต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอน	อ้างอิง
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	66.0	กลูโคส	Garay และคณะ, 2016
<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	61.4	กลูโคส	Garay และคณะ, 2016
<i>Cryptococcus aerius</i>	63.3	กลูโคส	Eroshin และคณะ, 1983
<i>C. psychrotolerans</i>	46.0	ไฮโดรไลเสตที่ ได้มาจากการ ย่อยเปลือกถั่ว ลิสงด้วยกรด	Deeba และคณะ, 2017
<i>L. tetrasporus</i>	66.5	กลูโคส	Eroshin และคณะ, 1983
<i>Rhodospodiobolus fluvialis</i> DMKU-RK253	63.8	กลีเซอรอลดิบ	Polburee และ คณะ, 2016
<i>R. fluvialis</i> DMKU-RK253	55.0	น้ำตาลจากกลี โนเซลลูโลส	Poontawee และ คณะ, 2017

2.3 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์น้ำมัน

2.3.1 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์ในสภาวะมีไนโตรเจนจำกัด

ในสภาวะที่แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำกัด แต่มีปริมาณคาร์บอนที่มากเกินไปส่งผลให้ความเข้มข้นของ AMP (adenosine monophosphate) ภายในเซลล์ลดลง เนื่องจากเอนไซม์ AMP-deaminase ทำหน้าที่เปลี่ยน AMP ให้กลายเป็น IMP (inosine monophosphate) และแอมโมเนียมไอออน ซึ่งแอมโมเนียมไอออนทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจนชั่วคราว สำหรับการ

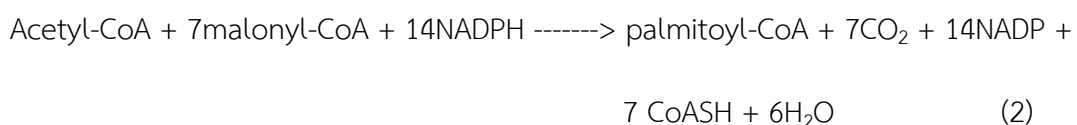
สังเคราะห์สารต่าง ๆ ภายในเซลล์ หลังจากแหล่งไนโตรเจนภายนอกเซลล์มีปริมาณจำกัด การลดลงของ AMP ทำให้การทำงานของวัฏจักรเครบส์เปลี่ยนแปลง เอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน isocitrate ไปเป็น alpha-ketoglutarate สูญเสียการทำงาน ส่งผลให้ภายในไมโทคอนเดรียเกิดการสะสมของ isocitrate ซึ่ง isocitrate ที่สะสมนี้จะถูกเปลี่ยนเป็น citrate โดยเอนไซม์ isocitrate acotinase จากนั้น citrate จะถูกส่งออกไปยังไซโทพลาสซึมผ่าน citrate/malate translocate เพื่อเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate โดยเอนไซม์ ATP-citrate lyase (ACL) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะในจุลินทรีย์น้ำมันเท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 2-5



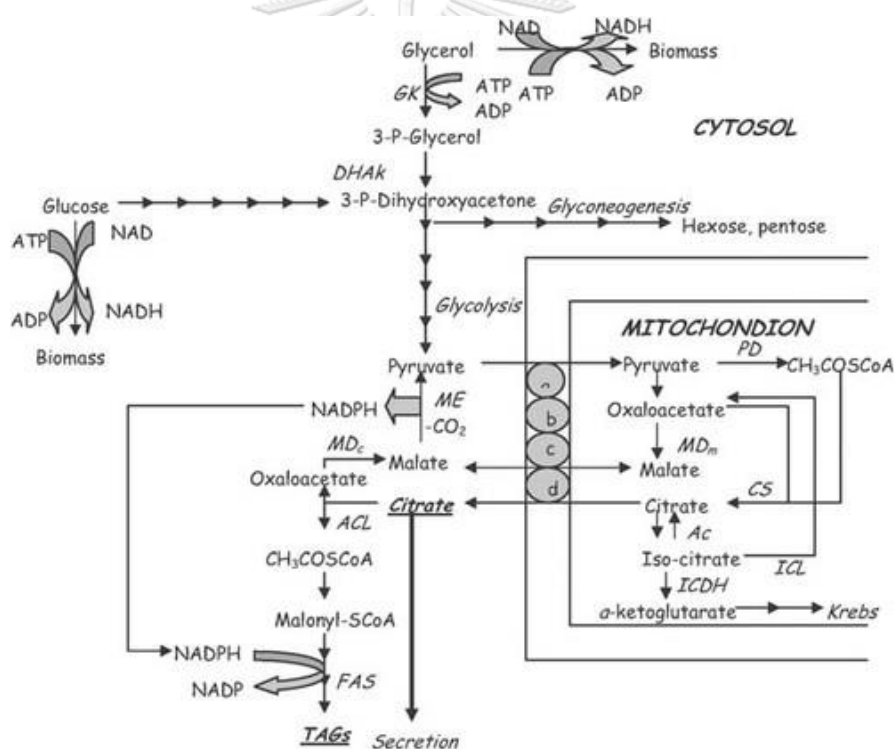
Acetyl-CoA จะถูกสังเคราะห์เป็น malonyl-CoA โดยมีเอนไซม์ biotin-dependent acetyl-CoA carboxylase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในสมการที่ (1) กลไกการสังเคราะห์ไขมันแสดงดังภาพที่ 2-6



หลังจากนั้น malonyl-CoA จะถูกนำไปสังเคราะห์เป็นกรดไขมันโดยเอนไซม์ fatty acid synthetase (FAS) ซึ่งเป็น multi enzymatic complex ดังแสดงในสมการที่ (2)

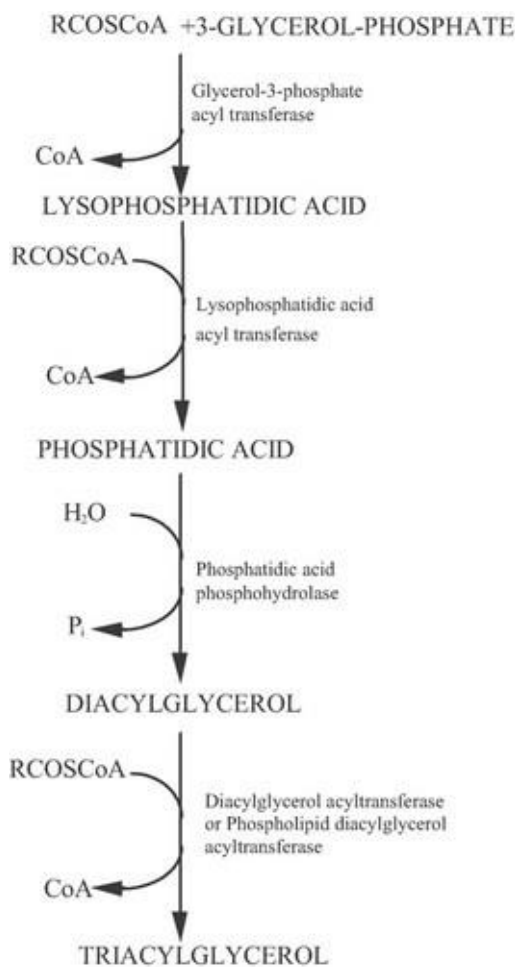


Fatty-CoA esters ที่ได้จะทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับกลีเซอรอล โดยกระบวนการสังเคราะห์ triacylglycerol (TAG) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การสังเคราะห์ diacylglycerol (DAG) และการเปลี่ยน DAG ไปเป็น TAG โดยปฏิกิริยา acylation ขั้นตอนแรก เอนไซม์ G-3-P acyltransferase เติมหมู่เอซิลให้แก่ glycerol-3-phosphate (G-3-P) ที่ตำแหน่ง Sn1 ได้เป็น 1-acyl-G-3P (lysophosphatidic acid-LPA) จากนั้น เอนไซม์ lysophosphatidic acid acyltransferase เติมหมู่เอซิลที่ตำแหน่ง Sn2 ให้แก่ LPA ได้เป็น phosphatidic acid (PA) จากนั้น เอนไซม์ phosphatidic acid phosphohydrolase เอาหมู่ฟอสเฟตออกจาก PA ได้เป็น DAG และในขั้นตอนสุดท้าย DAG จะถูกเปลี่ยนไปเป็น TAG โดยเอนไซม์ diacylglycerol acyltransferase เรียกกระบวนการสังเคราะห์ TAG ว่า alpha-glycerol phosphate acylation ดังแสดงในภาพที่ 2-7



ภาพที่ 2-6 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์น้ำมันในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด

(Papanikolaou และ Aggelis, 2011)



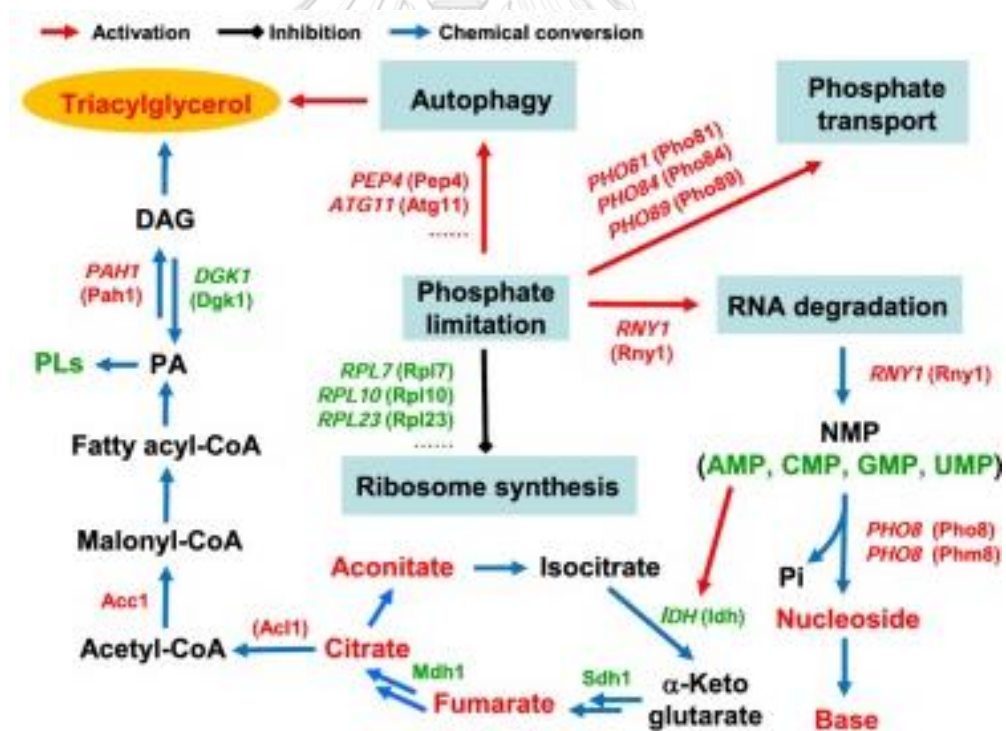
ภาพที่ 2-7 กระบวนการสังเคราะห์ TAG ผ่านวิถี alpha-glycerol phosphate acylation

(Papanikolaou และ Aggelis, 2011)

2.3.2 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์ในสภาวะที่มีฟอสเฟตเจือจาง

เซลล์ยีสต์เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีฟอสเฟตจำกัด การสังเคราะห์ไตรโบไซม์จะถูกยับยั้ง มีการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์มากขึ้น เพราะเซลล์ต้องการหาแหล่งฟอสเฟตชั่วคราวมาใช้ในการสังเคราะห์สารต่างๆ ภายในเซลล์ จึงเกิดการกระตุ้นการย่อยสลายอาร์เอ็นเอภายในเซลล์ โดยเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (RNase Rny1) ได้เป็น NMP (nucleotide monophosphate) จากนั้น NMP จะถูกย่อยสลายต่อด้วยเอนไซม์ phosphatases Pho8 และ Phm8 ได้เป็นนิวคลีโอไซด์ และฟอสเฟต ซึ่งฟอสเฟตที่ได้จะถูกเซลล์นำไปใช้เป็นแหล่งฟอสเฟตชั่วคราว จากการทำงานของเอนไซม์ phosphatases ทำให้เซลล์มีปริมาณนิวคลีโอไซด์เพิ่มขึ้น ปริมาณนิวคลีโอไทด์ชนิด AMP ลดลง ส่งผลให้เอนไซม์ isocitrate dehydrogenase (IDH) มี

แอคติวิตีลดลง เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นแบบอัลโลสเตอริก (allosteric system) ซึ่งถูกกระตุ้นได้ด้วยปริมาณ AMP ภายในเซลล์ ส่งผลให้ isocitrate เปลี่ยนไปเป็น oxalosuccinate ได้ลดลง เกิดการสะสมของ aconitrate และ citrate มากขึ้น ซึ่งปริมาณของ aconitrate และ succinate ที่สูงขึ้นจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase จากนั้น citrate จะถูกส่งออกไปยังไซโทพลาสซึม เพื่อเปลี่ยนไปเป็น acetyl-CoA โดยเอนไซม์ ATP-citrate lyase (ACL) และ acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจะถูกใช้เป็นส่วนตั้งต้นในการสังเคราะห์ TAG ต่อไป โดยกระบวนการสังเคราะห์จะเหมือนกับการสังเคราะห์ TAG ในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัดตั้งที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้ในสภาวะที่มีฟอสเฟตจำกัด เซลล์จะเกิดกระบวนการกลืนกินตัวเอง (autophagy) เพื่อให้ได้สารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ ที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ไขมันภายในเซลล์ได้ (Wang, และคณะ, 2018) กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์ในสภาวะที่มีฟอสเฟตเจินจำกัด ดังแสดงในภาพที่ 2-8



ภาพที่ 2-8 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันในสภาวะที่มีฟอสเฟตจำกัด

(Wang และคณะ, 2018)

2.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำมัน

2.4.1 แหล่งไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดส่งผลต่อปริมาณน้ำมันทั้งหมด และชนิดกรดไขมันของยีสต์ (Sitepu และคณะ, 2014) Evans และRatlidge (1984) ศึกษาการผลิตน้ำมันของยีสต์จำนวน 17 สายพันธุ์ ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ แอสพาราจีน และกลูตามेट เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ายีสต์มีปริมาณน้ำมันแตกต่างกันเล็กน้อย ยกเว้นยีสต์ *R. toruloides* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ จะมีปริมาณน้ำมันมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนแหล่งอนินทรีย์ Husain และHardin (1952) รายงานว่า *R. toruloides* ผลิตน้ำมัน และเซลล์ได้สูงที่สุดเมื่อเจริญในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีอัตราการผลิตน้ำมันสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

2.4.2 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

การสะสมน้ำมันของยีสต์จะถูกกระตุ้นเมื่อแหล่งไนโตรเจนในอาหารถูกใช้หมด อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลต่อการผลิตน้ำมันในเซลล์ยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์น้ำมันจะมีการสะสมน้ำมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นถึงจุดหนึ่ง (Sitepu และคณะ, 2014) Beopoulos และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตน้ำมันของยีสต์ *R. glutinis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจาก 150 เป็น 350 พบว่าปริมาณน้ำมันที่ผลิตเพิ่มขึ้นจาก 0.25 เป็น 0.40 กรัม/ลิตร

2.4.3 แหล่งคาร์บอน และปริมาณคาร์บอน

Kraisintu และคณะ (2010) รายงานว่า *R. toruloides* DMKU3-TK16 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้น 70 กรัม/ลิตร ผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 8.11 กรัม/ลิตร มีปริมาณน้ำมัน 64.43 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 13.56 กรัม/ลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารที่เพาะเลี้ยงเป็น 90 กรัม/ลิตร การผลิตน้ำมันลดลงเป็น 7.95 กรัม/ลิตร ปริมาณน้ำมันลดลงเป็น 62.11 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเป็น 13.14 กรัม/ลิตร Amaretti และคณะ (2010) รายงานว่า *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้น 120 กรัม/ลิตร ผลิตน้ำมันสูงสุด 19 กรัม/ลิตร ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 68 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.4.4 การให้อากาศ

การให้อากาศเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญ และปริมาณน้ำมันที่ผลิตของ ยีสต์ นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อยังส่งผลต่อองค์ประกอบกรดไขมันของ น้ำมันที่ยีสต์ผลิต Choi และคณะ (1982) ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการเจริญ และการสะสม น้ำมันของ *R. toruloides* พบว่าการให้อากาศส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเร็ว แต่มีปริมาณน้ำมันต่ำ โดยอัตราการผลิตน้ำมันเท่ากับ 0.012 กรัมไขมัน/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง/ชั่วโมง Babij และคณะ (1969) รายงานว่า น้ำมันของ *Candida utilis* ที่เจริญในสภาวะที่มีการให้ออกซิเจน มีปริมาณกรด ลิโนเลนิกเพิ่มขึ้น แต่กรดลิโนเลอิกลดลง

2.4.5 พีเอช

ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน ในช่วงตั้งแต่ พีเอช 3.0 ถึงพีเอช 7.0 (Ratray และคณะ, 1975) ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสะสมน้ำมันจะต่ำกว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ Angerbauer และคณะ (2008) ศึกษาการสะสมน้ำมันของยีสต์ *L. starkeyi* เมื่อใช้กากตะกอนที่ได้จากการบำบัดน้ำเสียเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์ผลิตและสะสม น้ำมันได้มากที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 5.0 และเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 6.5

2.4.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน โดยทั่วไป อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่สูงเกินไปหรือต่ำเกินไปส่งผลต่อการเจริญ และการสะสมน้ำมัน ในระหว่างที่ยีสต์สะสมน้ำมัน การลดอุณหภูมิลงจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการ เจริญจะส่งผลให้ปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้น และส่งผลต่อองค์ประกอบของน้ำมัน โดยทั่วไปแล้วจุด หลอมเหลวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะต่ำกว่าของกรดไขมันอิ่มตัว และจุดหลอมเหลวของกรดไขมัน สายสั้นจะต่ำกว่าของกรดไขมันสายยาว ดังนั้นการลดอุณหภูมิลงจะทำให้ปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกรดไขมันสายสั้นเพิ่มขึ้น (Sha, 2013) Ratray และคณะ (1975) รายงานว่า เมื่อลด อุณหภูมิลงจาก 25 องศาเซลเซียสเป็น 10 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อ *C. lipolytica* ผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้น และน้ำมันที่ผลิตมีอัตราส่วนของกรดลิโนเลอิกต่อกรดโอเลอิกสูงขึ้น

2.4.7 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

การสะสมน้ำมันในเซลล์ยีสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วงระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase) เนื่องจากน้ำมันจะถูกใช้สำหรับสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งเสริมการเจริญ แต่เมื่อเซลล์มีการเจริญเต็มที่แล้ว น้ำมันจะถูกเปลี่ยนมาเป็นน้ำมันที่เก็บสะสมไว้ในเซลล์ ในรูปของหยดน้ำมัน ซึ่งปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์จะสูงสุดในระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase) ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารจำกัด อัตราการสะสมน้ำมันจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งเข้าสู่ระยะเซลล์ตาย (death phase) น้ำมันที่สะสมจะถูกย่อยสลายกลายเป็นกรดไขมันอิสระอย่างรวดเร็ว ดังนั้นช่วงต้นของระยะคงจำนวนเซลล์จึงเป็นระยะที่ดีที่สุดในการเก็บเกี่ยวเซลล์ เพื่อไม่ให้ไขมันที่สะสมภายในเซลล์ถูกย่อยสลาย (Beopoulos และคณะ, 2008)

2.4.8 แร่ธาตุ และสารอาหาร

แมกนีเซียม โพแทสเซียม และแคลเซียมที่ความเข้มข้นต่ำมีความสำคัญต่อการเจริญ และการสะสมน้ำมันของยีสต์ (Spencer และคณะ, 1997) Rattray และคณะ (1975) รายงานว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 10% ยีสต์ *C. albicans* ผลิตน้ำมันได้สูงขึ้น นอกจากนี้มีรายงานว่า การขาดอินซิทอล กรดแพนโทเทนิค และไบโอติน ทำให้น้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ลดลง (Rattray และคณะ, 1975)

2.5 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546) จัดอยู่ใน ชั้น (Class) Dicotyledonea ชั้นย่อย (Subclass) Archichlamydea อันดับ (Order) Geraniales หรือ Euphorbiales วงศ์ (Family) Euphorbiaceae เผ่า (Tribe) Manihoteae สกุล (Genus) Manihot สปีชีส์ (Species) Esculenta เป็นไม้พุ่มยืนต้น (ดังภาพที่ 2-7) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบอเมริกาใต้ เช่น ประเทศบราซิล แม็กซิโก เปรู (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562) ปัจจุบันมีการปลูกมันสำปะหลังอย่างแพร่หลายที่บริเวณเขตภูมิอากาศร้อนชื้น และเขตกึ่งภูมิอากาศร้อนชื้นของเอเชีย แอฟริกา และลาตินอเมริกาเป็นพืชประเภทที่ให้พลังงานเป็นอันดับสามในเขตร้อน รองจากข้าว และข้าวโพด (Zhu และคณะ, 2015) ยังไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่ามันสำปะหลังถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเมื่อใด (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562)

มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีความทนทานต่อสภาพอากาศที่แห้งแล้งรุนแรง สามารถเจริญได้ในบริเวณที่ดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ บริเวณพื้นที่ดินชายขอบของพื้นที่เพาะปลูกที่ขาดต่อการปลูกพืช โดยทั่วไปแล้วมันสำปะหลังถือเป็นพืชที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ไรโบฟลาวิน วิตามินบี และกรดนิโคตินิก แต่ไม่มีโปรตีน (Zhu และคณะ, 2015)



ภาพที่ 2-9 ต้นมันสำปะหลัง

(ที่มา : <https://www.palangkaset.com>: ออนไลน์)

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย มันสำปะหลังที่นิยมปลูกในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ 1.) มันชนิดหวาน (sweet type) ที่มีปริมาณกรดไฮยาโนดต่ำ ไม่มีรสขม ใช้เพื่อการบริโภค และ 2.) มันชนิดขม (bitter type) ที่มีปริมาณกรดไฮยาโนดสูง ไม่เหมาะกับการบริโภคของคน หรือสัตว์ แต่มันชนิดขมมีปริมาณแป้งสูงจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปต่างๆ เช่น แป้งมัน มันอัดเม็ด และแอลกอฮอล์ เป็นต้น มันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นมันสำปะหลังชนิดขมสำหรับใช้ในอุตสาหกรรม (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562)

มันสำปะหลังเก็บสะสมอาหารไว้ในราก ในรูปคาร์โบไฮเดรต (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562: ออนไลน์) ปริมาณแป้งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดของหัวมันสำปะหลัง (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546) ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการสร้าง และสะสมแป้งในรากจะแตกต่างกันตามพันธุ์ อายุที่เก็บเกี่ยว ปริมาณน้ำฝนก่อนช่วงเก็บ

เกี่ยว ช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวหัวมัน (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546; มุลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562) หัวมันสำปะหลังที่อายุ 12 เดือน ได้รับปริมาณน้ำฝนเพียงพอ ไม่มีฝนตกชุกขณะเก็บเกี่ยวจะมีองค์ประกอบของหัวมัน (ตารางที่ 2-3) และของเนื้อมัน(ตารางที่ 2-2) ดังนี้

ตารางที่ 2-2 องค์ประกอบของหัวมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ต่อ 100 กรัมของน้ำหนักหัวมัน)
น้ำ	60.21-75.32
เปลือก	4.08-14.08
เนื้อ(แป้ง)	25.87-41.88
ไซยาไนด์(ppm)	2.85-39.27

(ที่มา :มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562)

ตารางที่ 2-3 องค์ประกอบของเนื้อมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้งเนื้อมัน)
แป้ง	71.9-85.0
โปรตีน	1.57-5.78
เยื่อใย	1.77-3.98
เถ้า	1.20-2.80
ไขมัน	0.06-0.43
คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่แป้ง	3.59-8.66

(ที่มา : มุลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562:)

การใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลังแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ คือ การนำไปบริโภคเป็นอาหาร การแปรรูปเป็นมันเส้น มันอัดเม็ด แป้งมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม และการนำไปผลิตเป็นแป้งมันสำปะหลังแปรรูป (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562)

ประเทศไทยถือว่าเป็นประเทศผู้ผลิตแป้งมันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดของโลก โดยผลิตได้มากกว่า 2 ล้านตันต่อปี (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562) ดังนั้นอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลังจึงจัดเป็นอุตสาหกรรมแปรรูปทางเกษตรกรรมหลักของประเทศไทย (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

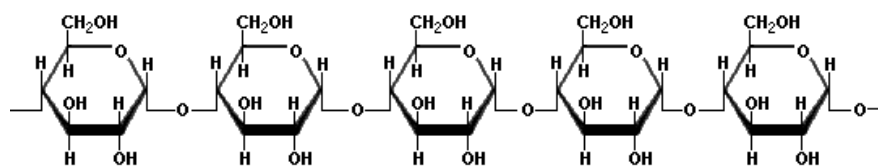
2.5.1 แป้ง(Starch)

แป้งมีสูตรเคมีทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ มีองค์ประกอบหลักคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนในอัตราส่วน 6:10:5 แป้งที่ยังมีสิ่งเจือปนอื่น ๆ เช่น โปรตีน เกลือแร่ อยู่มาก จะเรียกว่า ฟลาวัวร์ (flour) เช่น corn flour และ wheat flour หมายถึง แป้งข้าวโพดและแป้งสาลีที่ยังมีโปรตีนเจือปนอยู่มาก แต่เมื่อสิ่งเจือปนถูกกำจัดออกไปจนเหลือเป็นแป้งบริสุทธิ์เป็นส่วนใหญ่จะเรียกว่า แป้งสตาร์ช (starch) เช่น corn starch และ wheat starch เป็นต้น แป้งมันสำปะหลังที่ผลิตในประเทศไทยผลิตมีความบริสุทธิ์สูง จัดเป็นแป้งสตาร์ช (cassava starch) แป้งสตาร์ชที่ยังไม่ได้ผ่านการแปรรูปจะเรียกว่า แป้งดิบ (raw starch หรือ native starch) แป้งที่ถูกแปรรูปแล้วจะเรียกว่า โมดิไฟด์สตาร์ช (modified starch) หรือแป้งดัดแปร

แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) พอลิเมอร์ของกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบของแป้งมี 2 ชนิด ได้แก่ พอลิเมอร์เชิงเส้นหรืออะมิโลส และพอลิเมอร์เชิงกิ่งหรืออะมิโลเพกทิน

1. อะมิโลส

อะมิโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้น ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2000 หน่วยที่เชื่อมกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 (ดังภาพที่ 2-10) แป้งที่ได้จากธัญพืชจะมีปริมาณอะมิโลส ประมาณ 28% เช่น แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แต่แป้งที่ได้จากรากและหัวจะมีปริมาณอะมิโลส ประมาณ 20% เช่น แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น น้ำหนักโมเลกุลของอะมิโลสอยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^6 ดาลตัน ซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิดของแป้ง แป้งมันสำปะหลังมีขนาดของโมเลกุลหรือระดับการเกิดพอลิเมอร์ (Degree of polymerization) ของอะมิโลสอยู่ในช่วง 1000 ถึง 6000 อะมิโลสสามารถรวมตัวกับไอโอดีน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่ใช้บ่งบอกถึงแป้งที่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบ (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

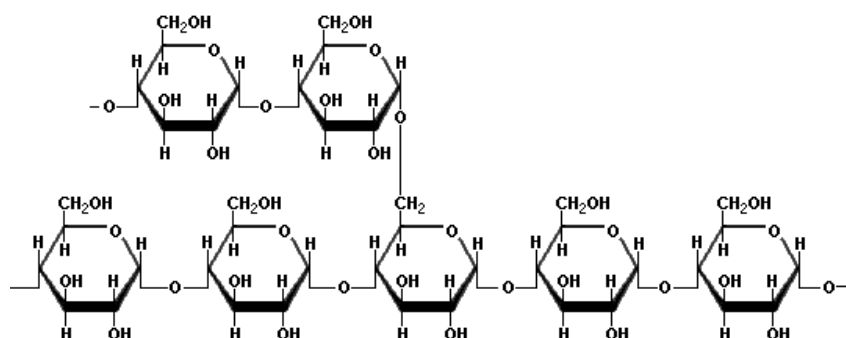


ภาพที่ 2-10 โครงสร้างอะมิโลส

(ที่มา : <http://www.food-info.net/uk/carbs/starch.htm> : ออนไลน์)

2. อะมิโลเพกทิน

อะมิโลเพกทินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส โดยพอลิเมอร์กลูโคสส่วนที่เป็นเส้นตรงจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 และส่วนที่เป็นกิ่งจะเป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้นเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,6 (ดังภาพที่ 2-11) จำนวนของกลูโคสที่เป็นกิ่งมีประมาณ 5% ของกลูโคสในอะมิโลเพกทินทั้งหมด ขนาดโมเลกุลของอะมิโลเพกทินในแป้งแต่ละชนิดมีค่าประมาณ 2 ล้านหน่วย น้ำหนักโมเลกุลของอะมิโลเพกทินมีค่าประมาณ 1000 เท่าของอะมิโลส คือ อยู่ในช่วง 10^7 ถึง 10^9 ดาลตัน (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)



ภาพที่ 2-11 โครงสร้างของอะมิโลเพกทิน

(ที่มา : <http://www.foodinfo.net/uk/carbs/starch.htm> : ออนไลน์)

แป้งที่มาจากแหล่งที่ต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะมิโลสและอะมิโลเพกทินต่างกัน ส่งผลให้แป้งมีคุณสมบัติต่างกัน สมบัติที่สำคัญของอะมิโลส และอะมิโลเพกทินแสดงดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 สมบัติที่สำคัญของอะมิโลส และอะมิโลเพกทิน

คุณสมบัติ	อะมิโลส	อะมิโลเพกทิน
โครงสร้าง	สารประกอบของน้ำตาลที่เกาะกันเป็นเส้นตรง	สารประกอบของน้ำตาลที่เกาะกันเป็นกิ่งก้าน
พันธะที่จับ	พันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4	พันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา-1,4 และแอลฟา-1,6
ขนาด	200 ถึง 2000 หน่วยกลูโคส	มากกว่า 1000 หน่วยกลูโคส
การละลาย	ละลายน้ำได้น้อยกว่า	ละลายน้ำได้มากกว่า
การทำปฏิกิริยากับไอโอดีน	ได้สีน้ำเงิน	ได้สีแดงม่วง
การจับตัว	เมื่อให้ความร้อนและทิ้งไว้ จะจับตัวเป็นวุ้นและแผ่นแข็ง	ไม่จับตัวเป็นแผ่นแข็ง

(ที่มา : กล้าณรงค์ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

แป้งที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของเม็ดแป้ง (granule) ขนาดเล็ก เม็ดแป้งมีโครงสร้างเป็นแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline) โมเลกุลของอะมิโลส และอะมิโลเพกทินจะเรียงตัวอยู่ในเม็ดแป้งที่เป็นโครงสร้างผลึก (crystalline) และโครงสร้างอสัณฐาน (amorphous) (กล้าณรงค์ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546) แป้งที่ได้จากธัญพืชจะมีโมเลกุลของอะมิโลเพกทินเป็นส่วนประกอบสำคัญของโครงสร้างผลึก โมเลกุลอะมิโลสจะรวมตัวกับไขมันทำให้โครงสร้างผลึกไม่แข็งแรง แป้งที่ได้จากหัวและราก โมเลกุลของอะมิโลเพกทินจะเรียงตัวอยู่ในโครงสร้างผลึก โมเลกุลของอะมิโลสจะเรียงตัวอยู่ในโครงสร้างอสัณฐาน (Van Der Maarel และคณะ, 2002)

2.5.2 แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch)

แป้งมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีขาวมันวาว ลักษณะเด่นของแป้งมันสำปะหลังคือ มีความบริสุทธิ์สูง มีสิ่งปนเปื้อนต่ำ มีปริมาณสตาร์ชเป็นองค์ประกอบมากกว่า 95% (ภาพที่ 2-12) เม็ดแป้งมีขนาดปานกลางอยู่ในช่วง 3 ถึง 40 ไมครอน ขนาดเฉลี่ยประมาณ 12 ถึง 15 ไมครอน ลักษณะของเม็ดแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นเม็ดกลมหรือรูปไข่ อาจมีรอยบุ๋มที่ปลายด้านหนึ่งของเม็ด (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546) กรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในแป้งมันสำปะหลัง ได้แก่ กรดปาล์มติก กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก และกรดลิโนเลนิก เมื่อเปรียบเทียบแป้ง

มันสำปะหลังกับแป้งที่ได้จากพืชชนิดอื่น ๆ แป้งมันสำปะหลังมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และฟอสฟอรัส น้อยกว่ามาก (Zhu และคณะ, 2015) โดยแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณโปรตีนและไขมันต่ำกว่า 1% และฟอสฟอรัสต่ำกว่า 0.04% ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของแป้งมันสำปะหลังขึ้นอยู่กับคุณภาพของ หัวมันสด และกระบวนการผลิต มาตรฐานทั่วไปของแป้งมันสำปะหลังแสดงดังตารางที่ 2-5



ภาพที่ 2-12 แป้งมันสำปะหลัง

(ที่มา :http://www.sonishstarch.com/th/products_th/product_tapioca_th/)

ตารางที่ 2-5 มาตรฐานของแป้งมันสำปะหลัง

ลักษณะ	ค่ามาตรฐานที่กำหนด
ปริมาณความชื้น (% สูงสุด)	13
ปริมาณแป้ง (% ต่ำสุด)	85
เถ้า (% สูงสุด)	0.2
พีเอช	5.0 ถึง 7.0
ความขาว (Kett scale, ค่าต่ำสุด)	90
ความหนืด (Barbender unit หรือ B.U., ค่าต่ำสุดที่ 6% ของความเข้มข้นของน้ำหนักรวมของแป้ง)	600
ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (ppm, ค่าสูงสุด)	30
ปริมาณไซยาไนด์	0
ลักษณะที่ปรากฏ	สีขาว ไม่มีจุด

(ที่มา : Breuninger และคณะ, 2009)

2.5.3 กระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์

2.5.3.1 การย่อยแป้งครั้งแรก (liquefaction)

เนื่องจากการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคสจำเป็นต้องทำให้น้ำแป้งสุก และเป็นของเหลวที่มีความหนืดต่ำก่อน ดังนั้นกระบวนการย่อยแป้งครั้งแรกจึงเป็นการทำให้น้ำแป้งกลายเป็นของเหลวที่มีความหนืดต่ำ โดยเอนไซม์ที่ใช้ควรเป็นเอนไซม์ประเภท endo-enzyme ซึ่งมีกิจกรรมภายในโมเลกุลของแป้ง ทำให้น้ำแป้งถูกย่อยเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ๆ เท่าๆ กันในเวลาสั้น และกลายเป็นของเหลวที่ค่อนข้างสมบูรณ์ มีความหนืดต่ำ มีค่า DE (dextrose equivalent) ต่ำกว่า 20 โอกาสที่แป้งจะจับตัวกันเป็นไปได้นั้น เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะมิเลส (alpha amylase) ซึ่งตัดพันธะแอลฟา-1,4 ระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น ไม่สามารถตัดพันธะแอลฟา-1,6 ได้ การทำงานเป็นการสุมัดภายใน ต้องการแคลเซียมไอออนร่วมในการทำงาน เอนไซม์นี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน มีความเสถียรที่พีเอช 5.5 ถึง 9.0 และที่อุณหภูมิห้องถึง 115 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้ผลิตได้จากพืช สัตว์ เชื้อรา และแบคทีเรีย ในอุตสาหกรรมจะใช้เอนไซม์ชนิดที่ผลิตมาจากเชื้อรา และแบคทีเรีย เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียจะสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

2.5.3.2 การย่อยแป้งครั้งสุดท้าย (saccharification)

การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น (DE สูงขึ้น) ขั้นตอนนี้พบการใช้เอนไซม์ 2 กลุ่ม ได้แก่ เอนไซม์ประเภท endo-enzyme เช่น แอลฟาอะมิเลส ได้น้ำเชื่อมกลูโคสที่มีค่า DE เท่ากับ 28-42 ซึ่งมีความเหนียว และมีความหวานพอดีเหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเอนไซม์ประเภท exo-enzyme ที่ย่อยโมเลกุลแป้งจากข้างนอกเข้ามา เช่น กลูโคอะมิเลส (glucoamylase) หรืออะมิโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase) ที่ตัดพันธะที่จับกันของกลูโคสทั้งพันธะแอลฟา-1,4 และพันธะแอลฟา-1,6 เอนไซม์ชนิดนี้ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำงาน มีความเสถียรที่พีเอช 3.5 ถึง 5.0 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Aspergillus niger* *A. oryzae* และ *Rhizopus* spp. ได้น้ำเชื่อมกลูโคสที่มีค่า DE สูง (DE มากกว่า 95) น้ำเชื่อมที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง มีจำนวนน้ำตาลกลูโคสต่อของแข็งทั้งหมดสูง เนื่องจากการตัดพันธะกึ่งเกิดซ้ำว่าการตัดพันธะแอลฟา-1,4 เพื่อให้ได้โมเลกุลกลูโคสการย่อยแป้งจึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มนี้ร่วมกัน (กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

แป้งมันสำปะหลัง ตราปลาไทย 5 ดาว ของ บริษัท อี.ที.ซี. อินเตอร์เนชั่นแนลเทรดดิ้ง จำกัด

3.2 เอนไซม์

3.2.1 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ $\geq 120,000$ ยูนิต/มิลลิลิตร (ความหนาแน่นรวมเท่ากับ 1.12-1.20 กรัม/มิลลิลิตร) ของบริษัท สยามวิคตอรี เดมิกอล จำกัด

3.2.2 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ $\geq 220,000$ ยูนิต/มิลลิลิตร (ความหนาแน่นรวมเท่ากับ 1.12-1.20 กรัม/มิลลิลิตร) ของบริษัท สยามวิคตอรี เดมิกอล จำกัด

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1 กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) Olympus BX51, USA

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

3.3.3 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) Agilent 6890N, Delaware, USA

3.3.4 เครื่องเขย่าสารชนิดตั้งโต๊ะ (shaker) Innova 2300, New Brunswick Scientific Co. Ltd., UK

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

3.3.6 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4-digital balance) AG285, Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland

- 3.3.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) Kubota 5922, Kubota Cooperation, Japan
- 3.3.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) Kubota 6500, Kubota Cooperation, Japan
- 3.3.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิได้สำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก (high speed refrigerated microtube centrifuge) Kubota 1920, Kubota Cooperation, Japan
- 3.3.10 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) G560, Scientific Industries Inc., USA
- 3.3.11 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Genesys™ 10S-UV-VIS, Thermo Scientific Inc., USA
- 3.3.12 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) S20 SevenEasy™, Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
- 3.3.13 เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพแบบหลายพารามิเตอร์ (biochemistry analyzer) YSI 7100 MBS, USA
- 3.3.14 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) N-100, Eyela, Japan
- 3.3.15 ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ -20 องศาเซลเซียส (freezer -20 °C) Forma Scientific, USA
- 3.3.16 ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ -80 องศาเซลเซียส (freezer -80 °C) Forma Scientific, USA
- 3.3.17 ตู้ดูดไอสารระเหยเคมี (fume hood) Flexlab, Thailand
- 3.3.18 ตู้บ่ม (incubator) SANYO, Japan
- 3.3.19 ตู้บ่มแบบเขย่า (incubator shaker) Innova 4330, New Brunswick Scientific Co. Ltd., UK
- 3.3.20 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) H2 LAB service Ltd., Thailand
- 3.3.21 ตู้อบแห้ง (oven) Contherm Scientific, New Zealand
- 3.3.22 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 5 มล., Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
- 3.3.23 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 5 มล. 1000, 200, 20, 10 ไมโครลิตร Gilson Company Inc., USA

- 3.3.24 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 10 มล., Eppendorf Co. Ltd., Thailand
- 3.3.25 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ES-215 TOMY Digital Biology Co. Ltd., Japan
- 3.3.26 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) SS-325 TOMY Digital Biology Co. Ltd., Japan
- 3.3.27 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) SS40-D, Grant Instrument Co. Ltd., UK
- 3.3.28 อ่างสั่นคลื่นเสียงความถี่สูง รุ่น Elma E30H Tovatech, USA

3.4 สารเคมี

- 3.4.1 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: HCl) Sigma Inc., Germany
- 3.4.2 กลูโคส (D-glucose: $C_6H_{12}O_6$) Sigma Inc, Germany
- 3.4.3 แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride: $CaCl_2$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.4 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide: $Ca(OH)_2$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.5 คลอโรฟอร์ม (chloroform (1% ethanol)) RCI Labscan Ltd., Thailand
- 3.4.6 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.8 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO) Fisher Scientific, UK
- 3.4.9 ไนล์เรด (Nile red: $C_{20}H_{18}N_2O_2$) Chem Impex Int'l Inc., USA
- 3.4.10 เบคโตเพปโตน (Bactopeptone) Becton Co. Ltd., Germany
- 3.4.11 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate: KH_2PO_4) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.12 เมทานอล (methanol) RCI Labscan Ltd., Thailand
- 3.4.13 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.14 ฐันผง (agar) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.4.15 ยีสต์สกัด (yeast extract) Becton Co. Ltd., Germany
- 3.4.16 เอทานอล (ethanol 99% (v/v)) Sigma Inc., Germany
- 3.4.17 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate: $(NH_4)_2SO_4$) Merck Co. Ltd.,

Germany

3.5 จุลินทรีย์

Lipomyces starkeyi JCM 5995 จาก Japan Collection of Microorganism ประเทศญี่ปุ่น

3.6 วิธีการ

3.6.1 คัดเลือกยีสต์น้ำมัน

3.6.1.1 การตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์เบื้องต้น

ตรวจสอบการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ 28 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี (Kunthiphun และคณะ, 2018) เบื้องต้น โดยเพาะเลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็งผลิตน้ำมัน (Lipid production medium) ที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 62.5 (Galafassi และคณะ, 2012) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ย้อมเซลล์ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ไนล์เรด (Nile red) เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรอะซิโตนที่เจือจาง 100 เท่าด้วย 25% (v/v) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ตรวจสอบดูหยดน้ำมันที่มีสีเหลืองทองภายในเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ค่าความยาวคลื่น excitation และ emission 470-490 และ 520 นาโนเมตรตามลำดับ กำลังขยาย 1,000 เท่า ผ่านฟิลเตอร์ U-WNB2 (Olympus BX51, USA) (Kimura และคณะ, 2004) คัดเลือกยีสต์ที่พบหยดน้ำมันสะสมภายในเซลล์ ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของเซลล์ มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันทั้งหมดภายในเซลล์

3.6.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.6.1.1 โดยเพาะเลี้ยงแบบ two stage fermentation (Lin และคณะ, 2014)

3.6.1.2.1 ขั้นตอนที่ 1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ ถ่ายโอนยีสต์ 1 ลูบ ลงในอาหาร

เหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายโอนเชื้อที่ได้ปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9803×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผลิตน้ำมัน

3.6.1.2.2 ขั้นตอนที่ 2 การผลิตน้ำมัน แขนวลอยเซลล์ทั้งหมดจากขั้นตอนที่ 1 ลง

ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผลิตน้ำมันสูตรเดิม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิมนาน 6 วัน ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 9803×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แขนวลอยเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำให้เซลล์แห้งแบบเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ สกัดน้ำมันที่สะสมในเซลล์ยีสต์ ด้วยวิธีของ Folch และคณะ (1957) แขนวลอยเซลล์แห้ง 0.5 กรัม ในสารละลายคลอโรฟอร์ม: เมทานอล อัตราส่วน 2:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) 10 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง 37 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำด้านบนที่ความเร็ว 19060×g 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.73% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ได้เป็น สารละลายคลอโรฟอร์ม:เมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 2:1:0.8 (ปริมาตร:ปริมาตร:ปริมาตร) ปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 540×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายชั้นล่างของคลอโรฟอร์ม มา ระเหยคลอโรฟอร์มออก ชั่งหาน้ำหนักของน้ำมันที่สกัดได้ คำนวณปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ผลิตและสะสม ภายในเซลล์ เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งเซลล์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) คัดเลือกยีสต์ที่ผลิตและ สะสมน้ำมันภายในเซลล์มากกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้งมาทำการทดลอง ต่อไป

3.6.2 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ *P. tsukubaensis* ผลิตและสะสมภายในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผลิตน้ำมันและในสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

3.6.2.1 ขั้นตอนที่ 1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ ถ่ายโอน *P. tsukubaensis* ซึ่งเจริญบน อาหารแข็ง YM 1 ลูบ ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายโอนเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 9803×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลวผลิตน้ำมันหรือสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

3.6.2.2 ขั้นตอนที่ 2 การผลิตน้ำมัน แขนวลอยเซลล์ที่เตรียมได้ทั้งหมด (จากข้อ

3.6.2.1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผลิตน้ำมัน หรือในสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 9803×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แขนวลอยในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำให้เซลล์แห้งแบบเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ ชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ผลิตและสะสมภายในเซลล์ (ตามวิธีข้อ 3.6.1.2.2)

3.6.3 การเตรียมไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง (ภาพที่ 3-1)

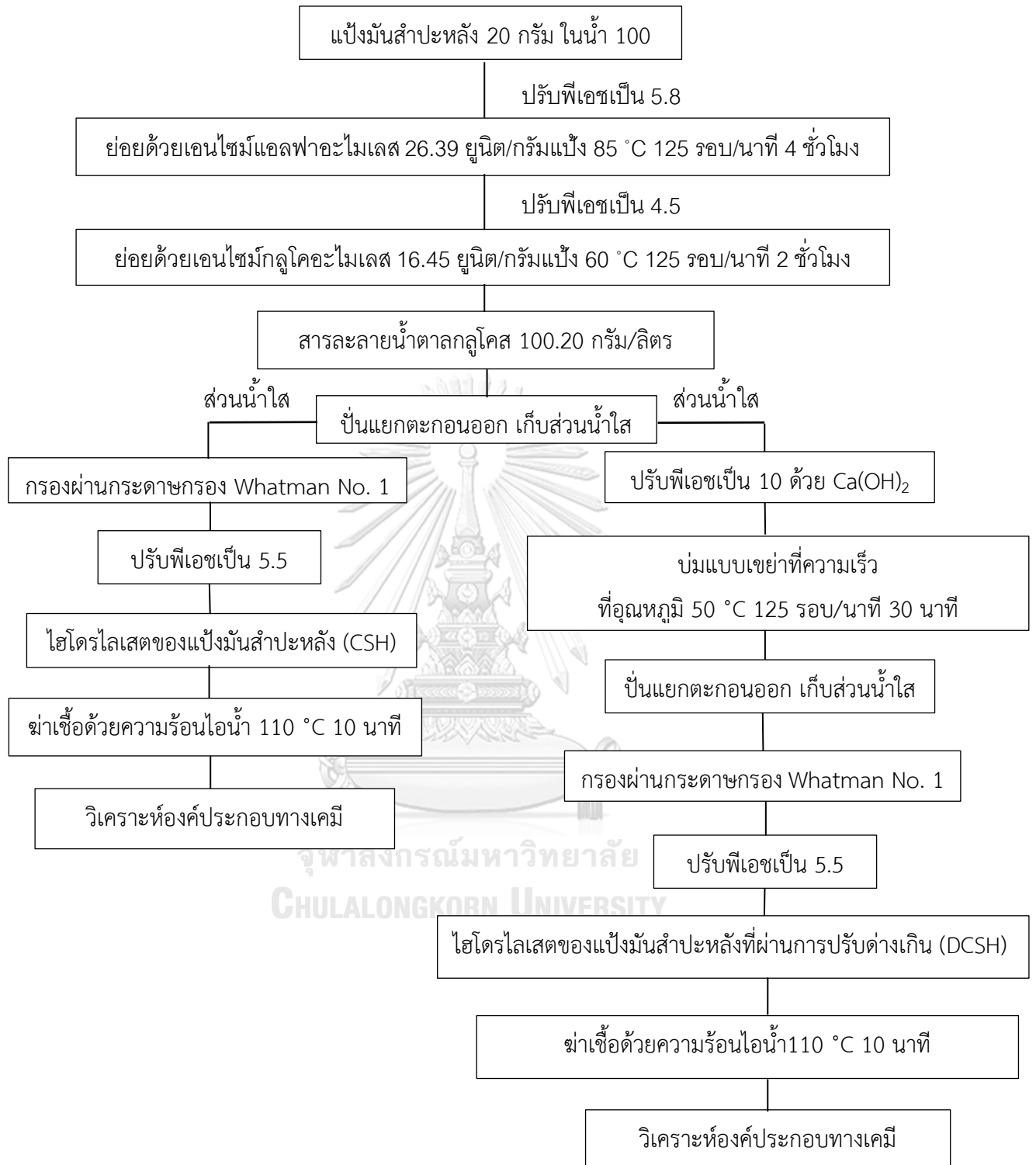
3.6.3.1 ย่อยแป้งมันสำปะหลังให้ได้สารละลายน้ำตาลกลูโคส 100.20 กรัม/ลิตร โดยแขวนลอยแป้งมันสำปะหลัง 20 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.8 ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 26.39 ยูนิต/กรัมแป้ง บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับพีเอชเป็น 4.5 ย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 16.45 ยูนิต/กรัมแป้ง บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบเท่าเดิม อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำใส (ไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง) ที่ความเร็ว 9803×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองแยกตะกอนออก ปรับพีเอชไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เตรียมได้เป็น 5.5 (Thippawan Wattanagonniyom, 2015) ทำให้ปราศจากเชื้อโดยให้ความร้อนไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้ผลิตน้ำมัน แทนไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังด้วยสัญลักษณ์ CSH ในขั้นตอนต่อไป

3.6.3.2 การปรับต่างเกิน (overliming) ไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังเพื่อตกตะกอนเกลือ (soluble salt) ซึ่งมีผลส่งเสริมการเจริญและกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ (Jönsson และคณะ, 2013) ทำโดยผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง จนกระทั่งพีเอชเท่ากับ 10 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที (Yu และคณะ, 2011) ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำใส (ไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง) ที่ผ่านการปรับต่างเกิน ที่ความเร็ว 9803×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองแยกตะกอนออก ปรับพีเอชไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับต่างเกินที่เตรียมได้เป็น 5.5 (Thippawan Wattanagonniyom, 2015) ทำให้ปราศจากเชื้อโดยให้ความร้อนไอน้ำที่อุณหภูมิ 110

องศา นาน 10 นาที เพื่อใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้ผลิตน้ำมันในขั้นตอนต่อไป และแทนไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับต่างเกินด้วยสัญลักษณ์ DCSH

3.6.3.3 นำไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.3.1 และ 3.6.3.2 มาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) (ส่งวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) วิเคราะห์ปริมาณไอออนโลหะต่าง ๆ ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส คอปเปอร์ ซิงค์ แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม ด้วยวิธี atomic absorption spectrometry และวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดด้วยวิธี ascorbic acid (Rice และคณะ , 2012) (ส่งวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)





ภาพที่ 3-1 แผนผังการเตรียมไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง

3.6.4 การเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ใน CSH และ DCSH

3.6.4.1 ขั้นตอนที่ 1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ ถ่ายโอน *P. tsukubaensis* YWT7-2 ซึ่งเจริญบนอาหารแข็ง YM1 ลูบลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายโอนเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหาร CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) ปริมาตรสุทธิ 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 9803×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย CSH หรือ DCSH แล้วนำเซลล์ทั้งหมดไปใช้ในขั้นตอนการผลิตน้ำมัน

3.6.4.2 ขั้นตอนที่ 2 การผลิตน้ำมัน แขนวลอยเซลล์ยีสต์ที่เตรียมได้ทั้งหมด (จากข้อ 3.6.4.1) ใน CSH หรือ DCSH ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 วัน ทุกวันปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 9803×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แขนวลอยเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำให้เซลล์แห้งแบบเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ ซึ่งหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ผลิตและสะสมภายในเซลล์ (ตามวิธีข้อ 3.6.1.2.2)

3.6.5 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ใน DCSH

3.6.5.1 การศึกษาผลของการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄) ใน DCSH ต่อการผลิตน้ำมัน

3.6.5.1.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำตามวิธีข้อ 3.6.4.1

3.6.5.1.2 การผลิตน้ำมัน ทำตามวิธีข้อ 3.6.4.2 โดยแขนวลอยเซลล์ยีสต์ที่เตรียมได้ทั้งหมด (จากข้อ 3.6.5.1.1) ใน DCSH ที่เติม 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

3.6.5.2 การศึกษาผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (NH₄)₂SO₄ ใน DCSH ต่อการผลิตน้ำมัน

3.6.5.2.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำตามวิธีข้อ 3.6.4.1

3.6.5.2.2 การผลิตน้ำมันทำตามวิธีข้อ 3.6.4.2 โดยแขวนลอยเชื้อเซลล์ยีสต์ที่เตรียมได้ทั้งหมด(จากข้อ 3.6.5.2.1) ใน DCSH ที่เติม 0.1% 0.25% หรือ 0.5%(น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต

3.6.5.3 การศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของ DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตน้ำมัน

3.6.5.3.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำตามวิธีข้อ 3.6.4.1

3.6.5.3.2 การผลิตน้ำมันทำตามวิธีข้อ 3.6.4.2 โดยแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่เตรียมได้ทั้งหมด (จากข้อ 3.6.5.3.1) ใน DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต ที่แปรผันพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 5.5 และ 6.0

3.6.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ซึ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ใน CSH ที่เติม 0.20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และในDCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

3.6.6.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ ถ่ายโอน *P. tsukubaensis* YWT7-2 ซึ่งเจริญบนอาหารแข็ง YM1 ลูบ ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายโอนเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงใน CSH ที่เติม 0.20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตหรือใน DCSH ที่เติม 0.20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาตรสุทธิ 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรให้เท่ากันเป็น 2.030 ± 0.020 บ่น เหยียงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 9803xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต พีเอช 5.5 นำเซลล์ทั้งหมดไปใช้ในขั้นตอนการผลิตน้ำมัน

3.6.6.2 การผลิตน้ำมันทำตามวิธีข้อ 3.6.4.2 โดยแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่เตรียมได้ทั้งหมด (จากข้อ 3.6.6.1) ใน DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต พีเอช 5.5

3.6.7 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เมื่อเติมร่วมกับ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตใน DCSH ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์

3.6.7.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ ถ่ายโอน *P. tsukubaensis* YWT7-2 ซึ่งเจริญบนอาหารแข็ง YM 1 ลูบ ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายโอนเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.1 และ 0.2% ปริมาตรสุทธิ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 9803×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต พีเอช 5.5 นำเซลล์ทั้งหมดไปใช้ในขั้นตอนการผลิตน้ำมัน

3.6.7.2 การผลิตน้ำมันยีสต์ ทำตามวิธีข้อ 3.6.5.4.2

3.6.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง ทั้งก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพแบบหลายพารามิเตอร์

3.6.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เตรียมได้

วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เตรียมได้จากอาหารผลิตน้ำมัน และไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ภาวะเหมาะสม โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Limsuwatthanathamrong และคณะ, 2012)

บทที่ 4

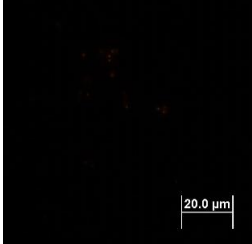
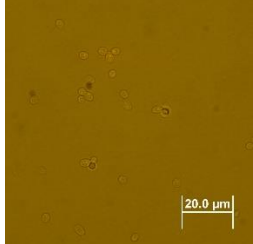

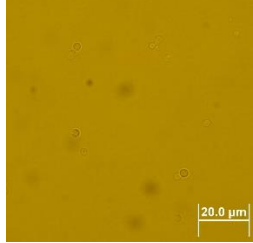
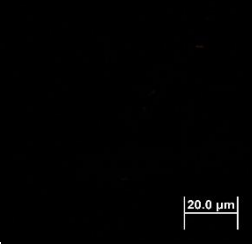
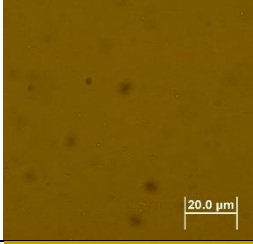

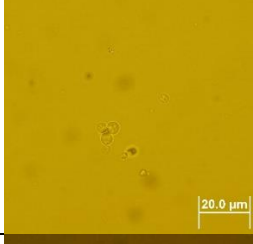
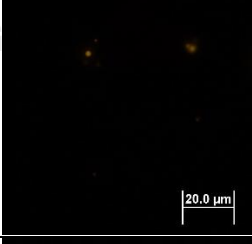
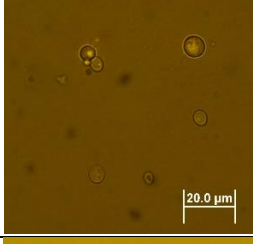
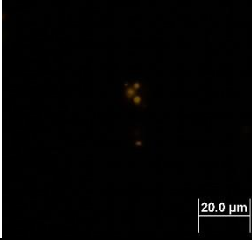
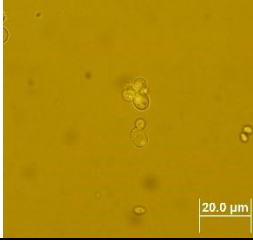
ผลการทดลองและอภิปรายผล


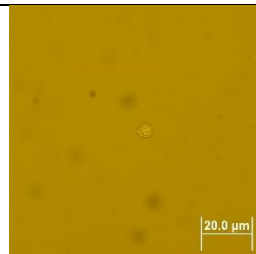

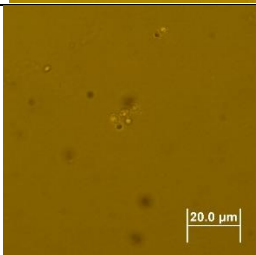

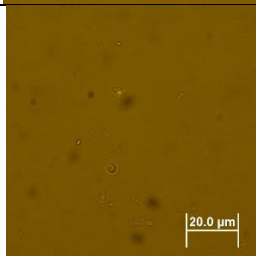
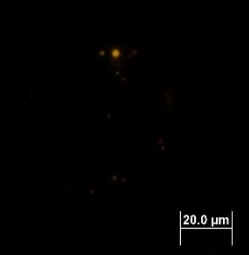
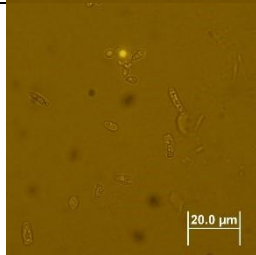
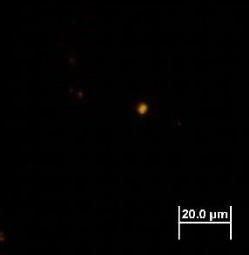
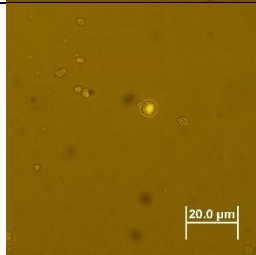
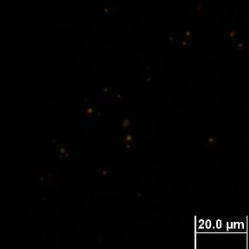
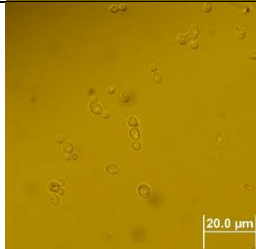
4.1 ผลการคัดเลือกยีสต์สะสมน้ำมันเบื้องต้น

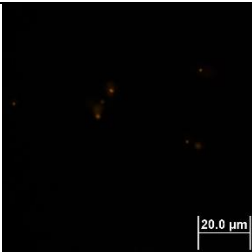
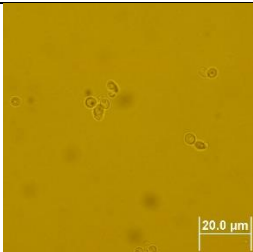
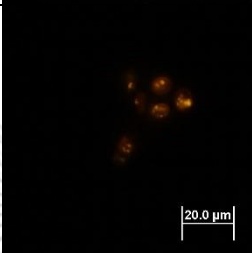
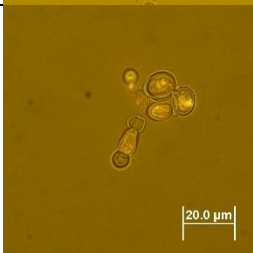
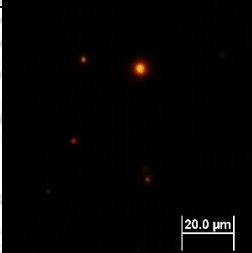
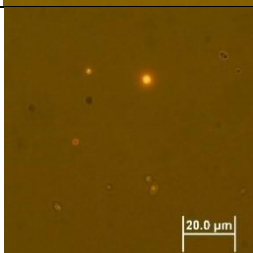
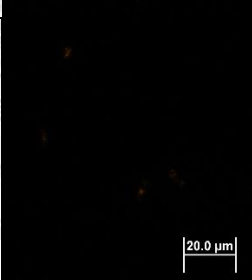
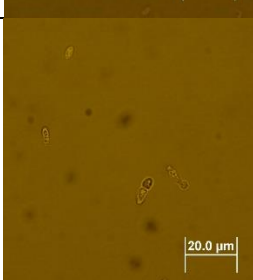

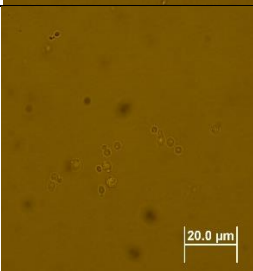
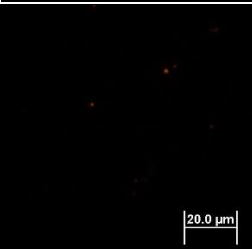
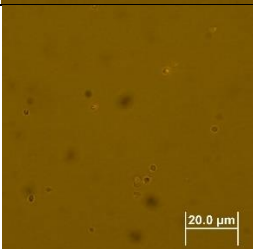
ผลการตรวจดูหยดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ทั้งหมดจำนวน 28 สายพันธุ์ (strain) ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี โดยการย้อมเซลล์ยีสต์ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ไนล์เรด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เปรียบเทียบกับยีสต์น้ำมัน *Lipomyces starkeyi* JCM 5995 (ชุดควบคุมบวก) พบว่ายีสต์จำนวน 8 สายพันธุ์ มีหยดน้ำมันภายในเซลล์ขนาดประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของเซลล์ ภาพที่ 4-1) ได้แก่ *Candida visiwathii* YMTW 12-2, *Debaryomyces vanriijiae* NS 4-2, *D. vanriijiae* SFL 10-1, *D. vanriijiae* SFL 17-2SF, *Geotrichum* sp. SRM 6-1, *Kodamaea ohmeri* NS 9-1, *Pseudozyma tsukubaensis* YWT 7-2 และ *Rhodospiridium toruloides* FRL 2-4

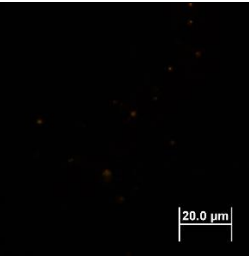
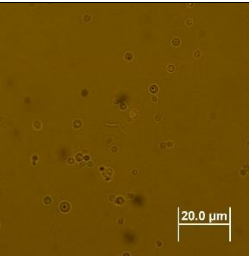

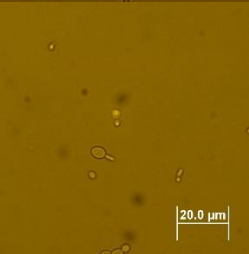
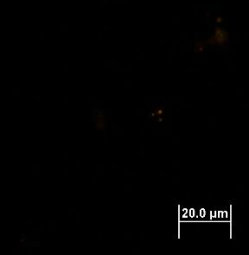
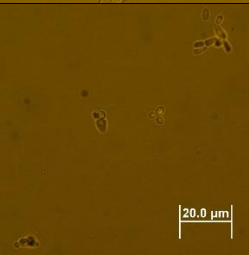

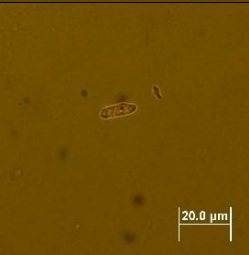
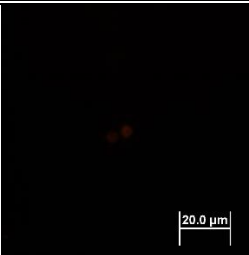
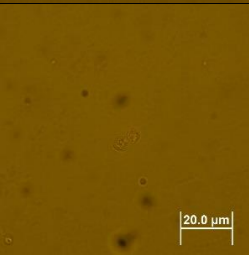
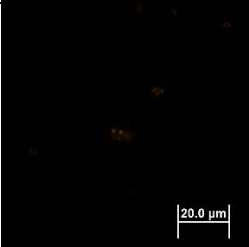
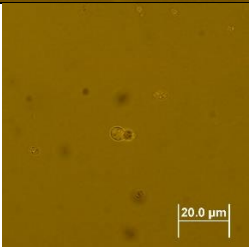
ภาพที่ 4-1 แสดงลักษณะหยดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ที่ย้อมติดสีไนล์เรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ กำลังขยาย 1000 เท่า

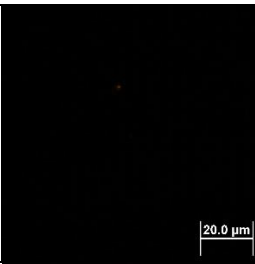
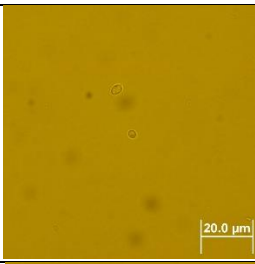

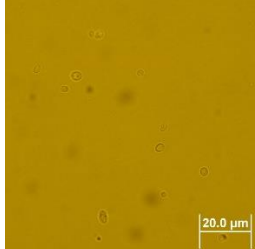
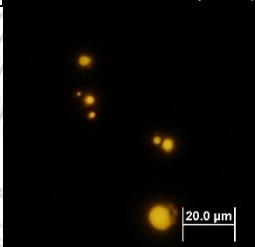
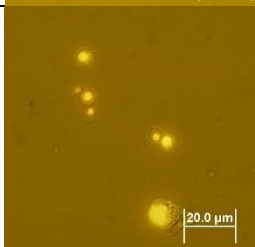
สายพันธุ์ยีสต์	แสงฟลูออเรสเซนต์	แสงฟลูออเรสเซนต์ และแสงขาว
<i>Blastobotrys</i> sp. FRN1-3	 20.0 μm	 20.0 μm
<i>Candida</i> sp. YMTW10-4	 20.0 μm	 20.0 μm

สายพันธุ์ยีสต์	แสงฟลูออเรสเซนซ์	แสงฟลูออเรสเซนซ์ และแสงขาว
<i>Candida</i> sp. SRM6-5		
<i>Candida</i> sp. PS1-8-2		
<i>Candida</i> sp. NS10-1		
<i>Candida thaimueangensis</i> FRL2-1		
<i>C. viswanathii</i> YMTW12-1		
<i>C. viswanathii</i> YMTW12-2		

สายพันธุ์ยีสต์	แสงฟลูออเรสเซนซ์	แสงฟลูออเรสเซนซ์ และแสงขาว
<i>Cryptococcus difflueus</i> FRL20-4		
<i>D. vanrijae</i> SFL17-2		
<i>D. vanrijae</i> NS4-1		
<i>D. vanrijae</i> NS4-2		
<i>D. vanrijae</i> SFL10-1		
<i>D. vanrijae</i> SFL11-3		

สายพันธุ์ยีสต์	แสงฟลูออเรสเซนซ์	แสงฟลูออเรสเซนซ์ และแสงขาว
<i>D. vanrijae</i> FRM4-2		
<i>Geotrichum</i> sp. SRM6-1		
<i>K. ohmeri</i> NS9-1		
<i>Kloeckera hetyaiensis</i> FRN2-2		
<i>Kuraishia piskuri</i> FRL20-5		
<i>Nakazawaea siamensis</i> SFL17-2SF		

สายพันธุ์ยีสต์	แสงฟลูออเรสเซนซ์	แสงฟลูออเรสเซนซ์ และแสงขาว
<i>Ogataea wangdongensis</i> FRN2-3		
<i>Pichia anomala</i> OMS14-1		
<i>P. anomala</i> OMS14-2		
<i>P. tsukubaensis</i> YWT7-2		
<i>R. sphaerocarpum</i> SFL 14-1SF		
<i>Rhodotorula taiwanensis</i> FRL2-3.		

สายพันธุ์ยีสต์	แสงฟลูออเรสเซนซ์	แสงฟลูออเรสเซนซ์ และแสงขาว
<i>Saccharomycopsis</i> sp. YWS 4-1		
<i>Wickerhamomyces</i> <i>anomalous</i> OMS 14-4		
<i>L. starkeyi</i> JCM 5995 (ชุดควบคุมบวก)		

4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันของยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 จำนวน 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4-1) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมันที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 62.5 เป็นเวลา 6 วัน พบว่ามียีสต์จำนวน 1 สายพันธุ์ เป็นยีสต์น้ำมัน เพราะสะสมน้ำมันมากกว่า 20% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง ได้แก่ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 สะสมน้ำมัน 31.36% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 9.81 กรัม/ลิตร คิดเป็นผลผลิตน้ำมันที่ได้ทั้งหมด (oil yield) เท่ากับ 3.08 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 4-1 น้ำมันสะสมในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ผลผลิตน้ำมันของยีสต์จำนวน 8 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

สายพันธุ์ยีสต์	น้ำมันสะสมในเซลล์ (% กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)
<i>C. visiwathii</i> YMTW12-2	3.67	7.98	0.29
<i>D. vanrijiae</i> NS4-2	9.19	12.10	1.11
<i>D. vanrijiae</i> SFL10-1	7.20	5.87	0.42
<i>D. vanrijiae</i> SFL17-2SF	3.31	6.26	0.21
<i>Geotrichum</i> sp. SRM6-1	4.76	10.50	0.50
<i>K. ohmeri</i> NS9-1	3.30	12.72	0.42
<i>P. tsukubaensis</i> YWT 7-2	31.36	9.81	3.08
<i>R. toruloides</i> FRL2-4	6.80	10.80	0.73
<i>L. starkeyi</i> JCM 5995 (ชุดควบคุมบวก)	37.72	10.81	4.08

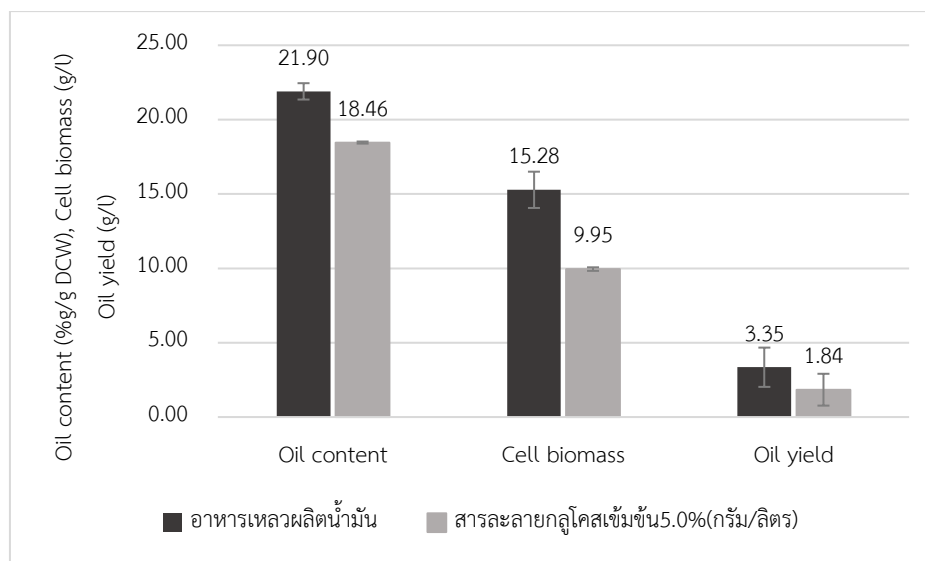
ในสภาวะที่มีคาร์บอนมาก มีไนโตรเจนจำกัดหรือมีฟอสฟอรัสจำกัด ยีสต์จะผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ในสภาพหยดน้ำมัน แต่เมื่อทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสมีปริมาณจำกัด หยดน้ำมันที่สร้างขึ้นจะรวมตัวกันเป็นหยดน้ำมันที่มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิม (Patel และคณะ, 2017) ดังนั้นเซลล์ที่มีอายุมากกว่าก็มีโอกาสพบหยดน้ำมันที่มีขนาดใหญ่กว่า ยีสต์ทั้ง 8 สายพันธุ์ อาจมีอัตราการเจริญต่างกัน ยีสต์ที่เจริญเร็วกว่าจะมีจำนวนเซลล์ที่มีหยดน้ำมันขนาดใหญ่มากเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่การนำเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์นั้น เป็นการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ต่อจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน จึงอาจพบว่ามีปริมาณน้ำมันที่ต่ำกว่า

P. tsukubaensis เป็นยีสต์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น Golubev และคณะ (2006) รายงานว่า *P. tsukubaensis* ผลิตสารยับยั้งการเจริญของราในคลาส Ustilaginomycetes Jeya และคณะ (2009) รายงานว่า *P. tsukubaensis* KN 75 ซึ่งเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบดจ์ ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตอีริทริทอล (erythritol) 245 กรัม/ลิตร

ซึ่งเป็นปริมาณอิทธิพลที่สูงที่สุดที่เคยมีการรายงานว่าผลิตโดยจุลินทรีย์ Fai และคณะ (2014) รายงานว่ายีสต์ *P. tsukubaensis* ที่แยกได้จากเนคทารีน ผลิตกาแล็กโทโอลิโกแซ็กคาไรด์จากสารละลายแกล็กโทสเข้มข้น 40% (น้ำหนัก/ปริมาตร) Fai และคณะ (2015) รายงานว่ายีสต์ *P. tsukubaensis* ผลิต mannosylerythritol lipid ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สำคัญชนิดหนึ่ง ผลการวิจัยนี้นับเป็นครั้งแรกที่พบว่ายีสต์ *P. tsukubaensis* มีคุณสมบัติเป็นยีสต์น้ำมัน

4.3 ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ผลิตและสะสม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมันและสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ยีสต์ *P. Tsukubaensis* YWT 7-2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมันเป็นเวลา 6 วัน พบว่ามีน้ำมันที่สะสมในเซลล์ (oil content) และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 21.90% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง และ 15.28 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลผลิตน้ำมันทั้งหมดเท่ากับ 3.35 กรัม/ลิตร (ดังภาพที่ 4-2) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นเวลา 6 วัน พบว่ามีน้ำมันสะสมในเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 18.46% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง และ 9.95 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ผลผลิตน้ำมันทั้งหมดเท่ากับ 1.84 กรัม/ลิตร (ดังภาพที่ 4-2) การที่ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน สามารถผลิตน้ำมันได้สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสถานะที่ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ไม่สามารถเจริญได้อย่างปกติ เพราะมีไนโตรเจนจำกัด ในขณะที่มีคาร์บอนปริมาณมาก *P. tsukubaensis* YWT 7-2 สามารถนำคาร์บอนที่ยังมีปริมาณมากนี้ไปสังเคราะห์เป็นไขมันสะสมไว้ในเซลล์ แต่ทั้งนี้ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ยังต้องการสารอาหารบางชนิด ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์น้ำมัน หรือโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ต่างๆ แสดงว่าการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ไม่สามารถแยกออกจากการเจริญในบางครั้งได้เลย Lin และคณะ (2011) รายงานว่า การสะสมน้ำมันของยีสต์ *Lipomyces starkeyi* AS. 2.1560 สามารถแยกออกจากการเจริญได้ในบางครั้ง เพราะพบว่าการผลิตน้ำมันของ *L. starkeyi* AS. 2.1560 แบบ two stage fermentation นั้นขั้นตอนแรกเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ และจากนั้นผลิตน้ำมันโดยแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ได้ในสารละลายกลูโคสเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสถานะที่มีเฉพาะคาร์บอนเท่านั้น ยีสต์ *L. starkeyi* AS. 2.1560 ยังสามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้สูงถึง 58.6% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง



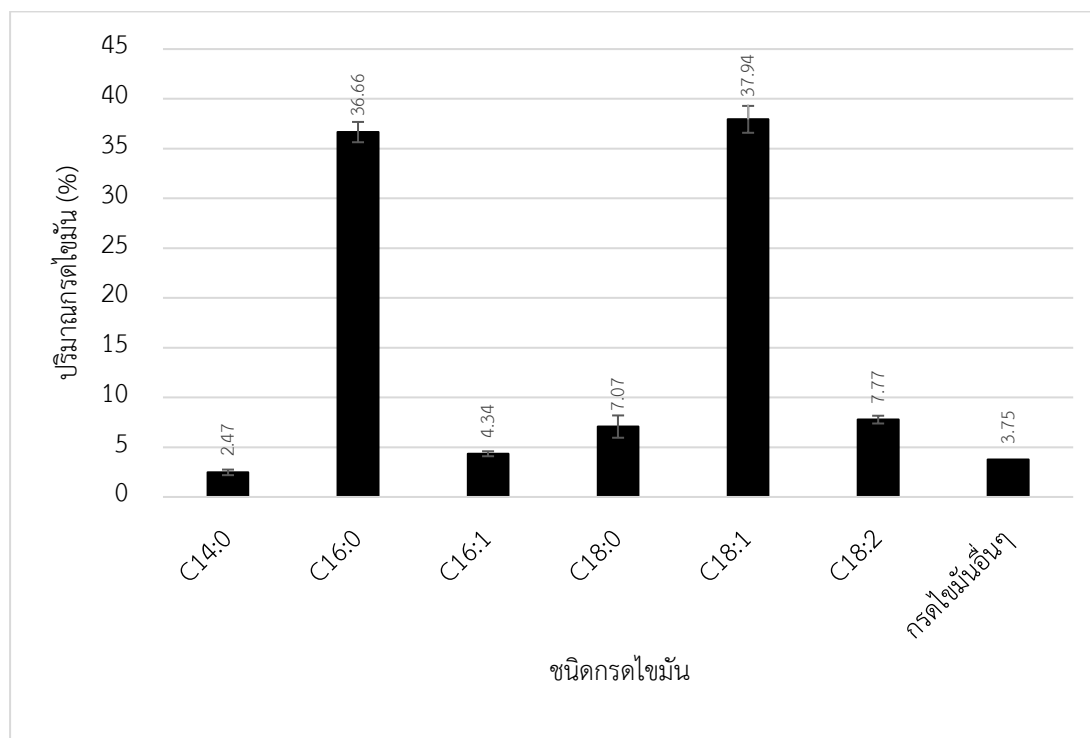
ภาพที่ 4-2 การเปรียบเทียบ น้ำมันสะสมในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ผลผลิตน้ำมันทั้งหมดของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน และสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

4.4 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเมื่อผลิตน้ำมันในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน

ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เตรียมได้ (ภาพที่ 4-3) พบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักมีคาร์บอนจำนวน 16 และ 18 อะตอม โดยมีกรดโอเลอิก (C18:1) สูงที่สุดเท่ากับ 37.94% ของกรดไขมันทั้งหมด รองลงมาเป็นกรดปาล์มิติก (C16:0) กรดลิโนเลอิก (C18:2) และกรดสเตียริก (C18:0) เท่ากับ 36.66% 7.77% และ 7.07% ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันยีสต์ส่วนใหญ่คือ กรดโอเลอิก กรดปาล์มิติก และกรดสเตียริก (Meesters และคณะ, 1996) ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดหลักที่พบในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันคาโนลา น้ำมันดอกทานตะวัน เป็นต้น (Ageitos และคณะ, 2011) ดังนั้น น้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 จึงเหมาะที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเป็นไบโอดีเซล

กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันยีสต์ *Y. lipolytica* ที่เพาะเลี้ยงแบบแบดซ์ในอาหารสังเคราะห์ที่มีกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid) เป็นแหล่งคาร์บอน ในทุกสภาวะของการเพาะเลี้ยงคือ กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก กรดโอเลอิก และกรดลิโนเลอิก (Gao และคณะ, 2017) นอกจากนี้ในน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ยังพบ กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) ซึ่ง

เป็นกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ กรดปาล์มิโตเลอิกถูกนำไปใช้งานอย่างกว้างขวางด้านการแพทย์ และเครื่องสำอาง และพบกรดลิโนเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญไขมัน กรดไขมันชนิดนี้ได้รับการพิสูจน์ว่ามีผลดีต่อการนำมาใช้รักษาโรคมามากมาย (Kolouchová และคณะ, 2016)



ภาพที่ 4-3 ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง

องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังดังแสดงในตารางที่ 4-2 พบว่ามีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่ำกว่า 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ดังนั้นไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังจึงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นอาหารผลิตน้ำมัน เมื่อนำไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังมาปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าปริมาณของฟอสฟอรัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4-2 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง

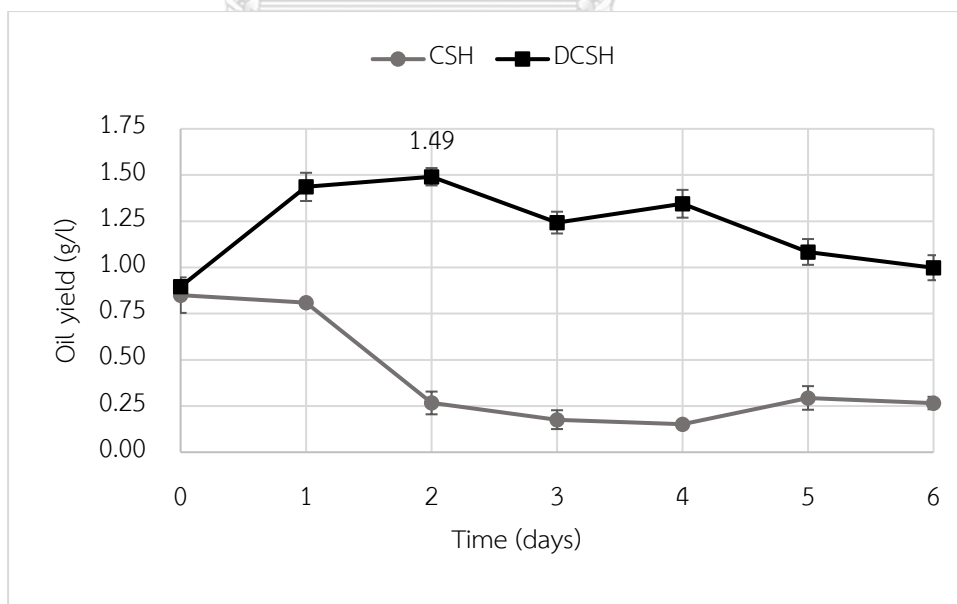
องค์ประกอบ	CSH*	DCSH**
ไนโตรเจน (มิลลิกรัม/ลิตร)	-	-
แร่ธาตุ (มิลลิกรัม/ลิตร)		
เหล็ก	0.11	0.17
แมงกานีส	0.08	0.12
คอปเปอร์	<0.10	<0.10
แร่ธาตุ (มิลลิกรัม/ลิตร)		
ซิงก์	0.14	0.35
แคลเซียม	7.81	137
แมกนีเซียม	13.2	13.6
โพแทสเซียม	25.0	23.8
ฟอสฟอรัสทั้งหมด	2.69	1.62
น้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร)	95.67	93.50

4.6 ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ใน CSH และ DCSH

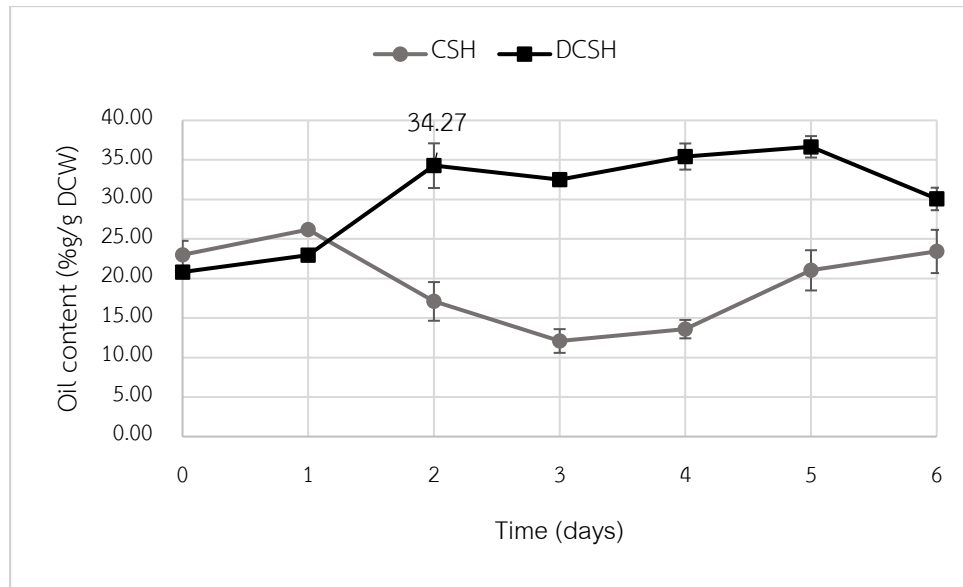
เพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วแขวนลอยเซลล์ที่ได้ใน CSH และ DCSH ในขั้นตอนการผลิตน้ำมัน

ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ผลิต เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ใน CSH และ DCSH เป็นเวลา 6 วัน พบว่า *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ที่เพาะเลี้ยงใน DCSH มีผลผลิตน้ำมันทั้งหมด น้ำมันสะสมในเซลล์ (oil content) และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงใน CSH โดยยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน DCSH ผลิตน้ำมันทั้งหมดได้สูงสุดที่วันที่ 2 เท่ากับ 1.49 กรัม/ลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตน้ำมัน (oil productivity) เท่ากับ 0.75 กรัม/ลิตร/วัน (ภาพที่ 4-4) ที่วันที่ 2 นี้เซลล์มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เท่ากับ 34.27% (กรัม/กรัม) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 4-5) และให้น้ำหนักเซลล์แห้งกับ 4.36 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4-6) จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและไอออนของโลหะบางชนิดใน CSH เปรียบเทียบกับ DCSH (ตารางที่ 4-2) พบว่า DCSH มีปริมาณแมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) ซิงก์ไอออน (Zn^{2+}) แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) สูงกว่า CSH มีรายงานว่าไอออนโลหะเหล่านี้ที่ความเข้มข้นเหมาะสมทำให้ยีสต์เจริญ และสะสมน้ำมัน

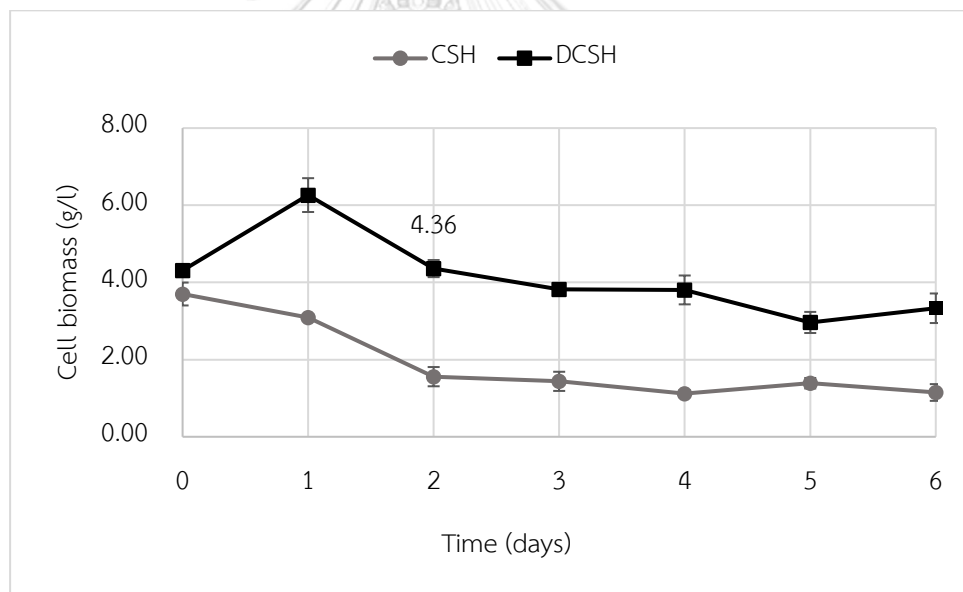
สูงขึ้น (Zhao และคณะ, 2008; Zhu และคณะ, 2008) เพราะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตและสะสมน้ำมัน (Jernejc และLegiša, 2002) การเติม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ และ KCl ที่ความเข้มข้นเหมาะสมลงในไฮโดรไลเสตของซังข้าวโพด ทำให้ *Trichosporon cutaneum* เจริญและผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้น (Chen และคณะ, 2013) แมงกานีสไอออน แคลเซียมไอออน ซิงก์ไอออน และโอโรอน (III) ไอออน (Fe^{3+}) ที่ความเข้มข้นเหมาะสมทำให้ *Rhodospiridium toruloides* 21167 ผลิตและสะสมน้ำมันเพิ่มขึ้น (Wang และคณะ, 2012) แคลเซียมไอออนทำให้ *L. starkeyi* ผลิตน้ำมันมากขึ้น แต่ซิงก์ไอออน และแมงกานีสไอออน ยับยั้งการผลิตน้ำมันของ *L. starkeyi* (Naganuma และคณะ, 1985) นอกจากนี้การปรับต่างเกินยังเป็นการกำจัดเกลือ (soluble salt) ที่มากเกินไปออกจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง (Jönsson และคณะ, 2013) ซึ่งอาจส่งผลให้ยีสต์สามารถเจริญและผลิตน้ำมันใน DCSH ได้สูงกว่าใน CSH Huang และคณะ (2009) รายงานว่า *T. fermentans* ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตของฟางข้าวที่ผ่านการปรับต่างเกิน แล้วดูดซับด้วย Amberlite XD-4 ผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นจาก 1.7 กรัม/ลิตร เป็น 11.5 กรัม/ลิตร Huang และคณะ (2013) พบว่า *T. coremiiforme* ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตของซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับต่างเกิน แล้วดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ เจริญและผลิตน้ำมันได้มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตของซังข้าวโพดที่ไม่ผ่านการปรับต่างเกิน



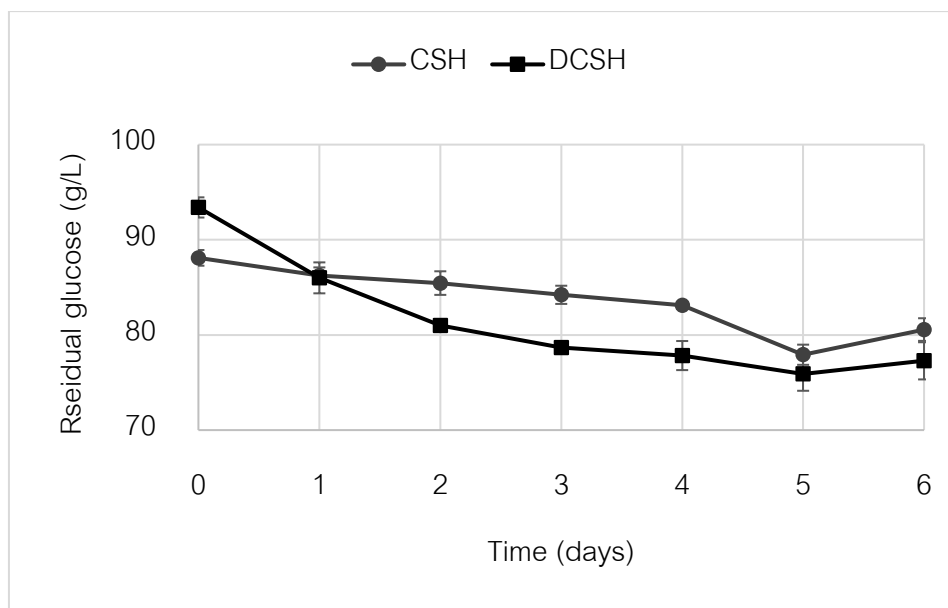
ภาพที่ 4-4 เปรียบเทียบผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน CSH และ DCSH



ภาพที่ 4-5 เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน CSH และ DCSH



ภาพที่ 4-6 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงใน CSH และ DCSH



ภาพที่ 4-7 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน CSH และ DCSH

4.7 ผลการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ใน DCSH

เพิ่มจำนวนเซลล์ใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต แล้ว แขนวลอยเซลล์ที่ได้ใน DCSH ที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต หรือแอมโมเนียมซัลเฟตใน ขั้นตอนการผลิตน้ำมัน

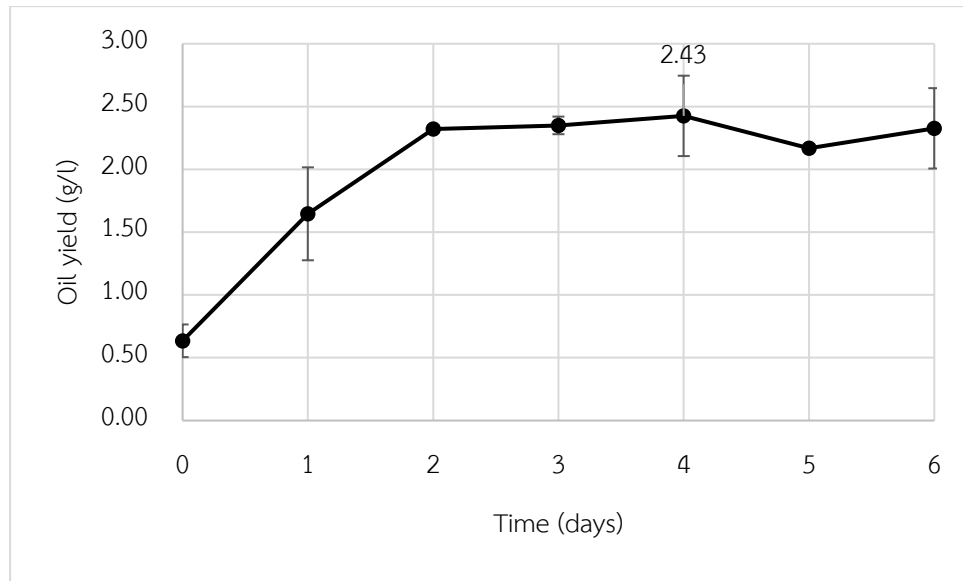
4.7.1 ผลของการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ลงใน DCSH ต่อการผลิตน้ำมันของ *P. tsukubaensis* YWT7-2

จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี CSH และ DCSH พบว่า DCSH มีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำกว่า CSH อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4-2) จึงได้ศึกษาผลของการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตลงใน DCSH ต่อการผลิตน้ำมันของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ทั้งนี้เพราะยีสต์สะสมน้ำมันในรูปหยดน้ำมัน ซึ่งห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อที่มีฟอสโฟลิพิดเป็นองค์ประกอบ (Qin และคณะ, 2017)

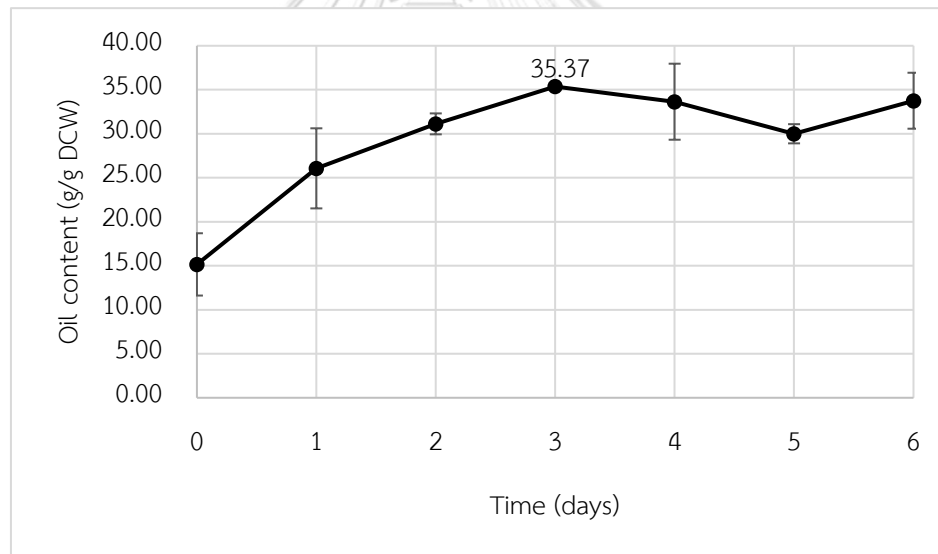
ผลการผลิตน้ำมันของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงใน DCSH ที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นเวลา 6 วัน พบว่าผลผลิตน้ำมันสูงสุด 2.43 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4-8) สูงกว่าเมื่อแขวนลอยเซลล์ใน DCSH ซึ่งไม่เติมโพแทสเซียม

ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (1.49 กรัม/ลิตร) (ภาพที่ 4-4) แต่อัตราการผลิตน้ำมันลดลงจาก 0.75 เป็น 0.61 กรัม/ลิตร/วัน ทั้งนี้เพราะปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุดลดลงจาก 36.66 เป็น 35.37% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง แม้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดจะเพิ่มจาก 6.26 เป็น 7.46 กรัม/ลิตร ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากฟอสเฟตที่เติมลงไปถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญก่อน ทั้งนี้เพราะฟอสฟอรัสเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเจริญและกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โคเอนไซม์ เป็นต้น (Liang และคณะ, 2013) นอกจากนี้ฟอสฟอรัสยังมีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์แหล่งพลังงานที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เช่น Adenosine triphosphate (ATP) และ Nicotinamine adenin dinucleotide phosphate (NADP) เป็นต้น (Mostafa และ Amal, 1994) การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 3.6 กรัม/ลิตร ลงในอาหารผลิตน้ำมัน พบว่า *Trichosporon fermentans* CICC1368 มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ลดลง แต่น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น (Bao และคณะ, 2018)

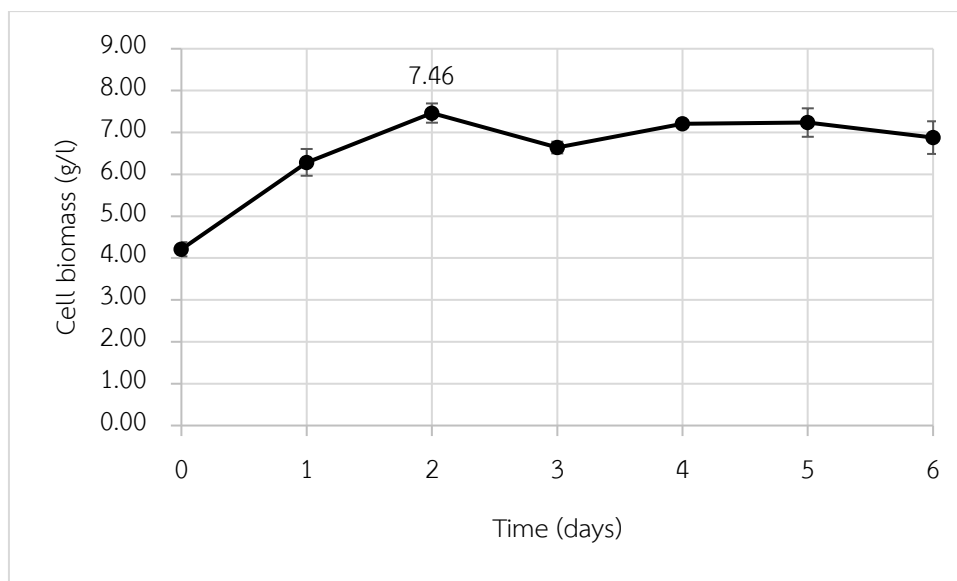
ยีสต์จะผลิตและสะสมน้ำมันได้ในปริมาณสูง ในสภาวะที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำ เมื่ออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีความเหมาะสม (Ratledge และ Wynn, 2002) เนื่องจาก DCSH มีปริมาณไนโตรเจนต่ำมาก ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงได้ศึกษาผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงใน DCSH ต่อการผลิตน้ำมัน



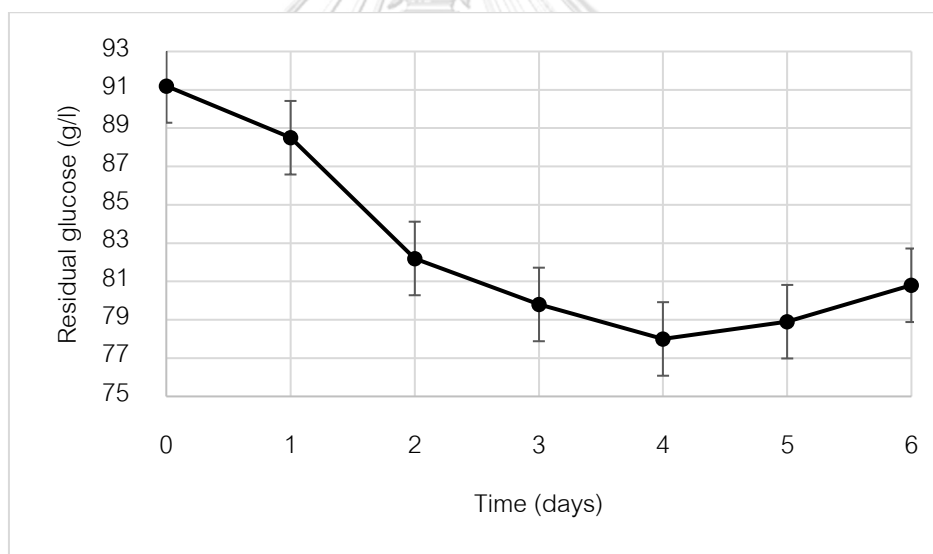
ภาพที่ 4-8 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)



ภาพที่ 4-9 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)



ภาพที่ 4-10 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร DCSH ที่เติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)



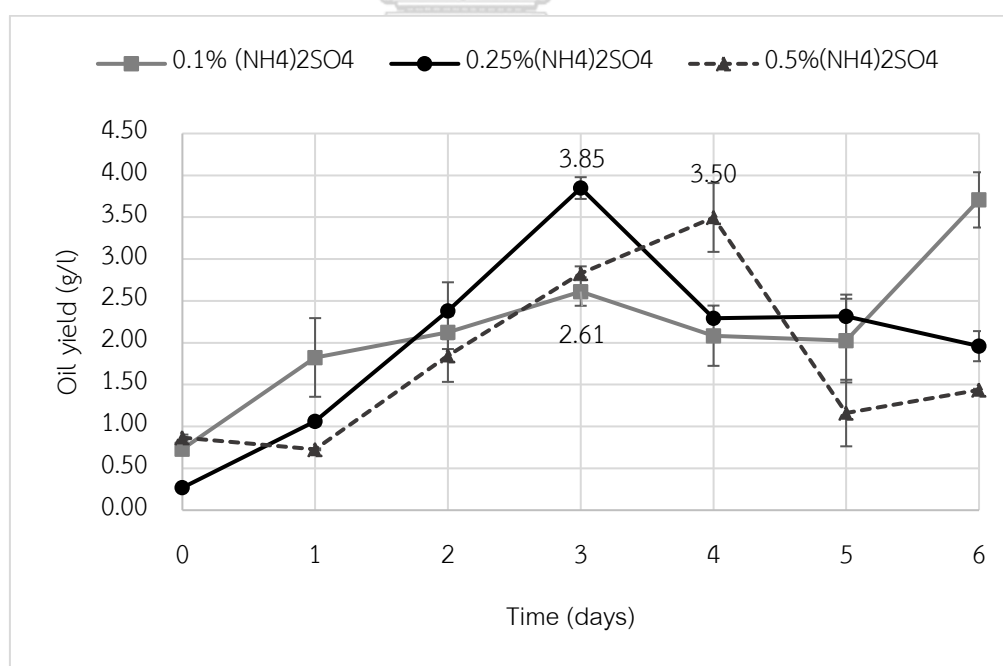
ภาพที่ 4-11 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

4.7.2 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตใน DCSH ต่อการผลิตน้ำมันของ

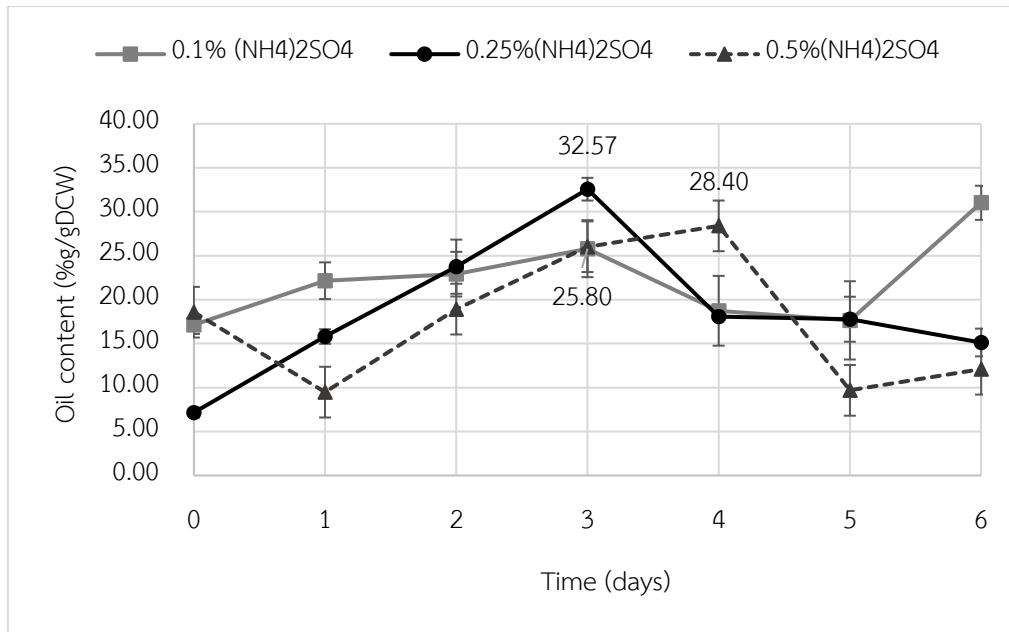
P. tsukubaensis YWT7-2

ผลการเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม 0.1, 0.25 และ 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า *P. tsukubaensis* YWT7-2 ผลิตน้ำมันได้สูงที่สุดใน DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3.85 กรัม/ลิตร (อัตราการผลิต

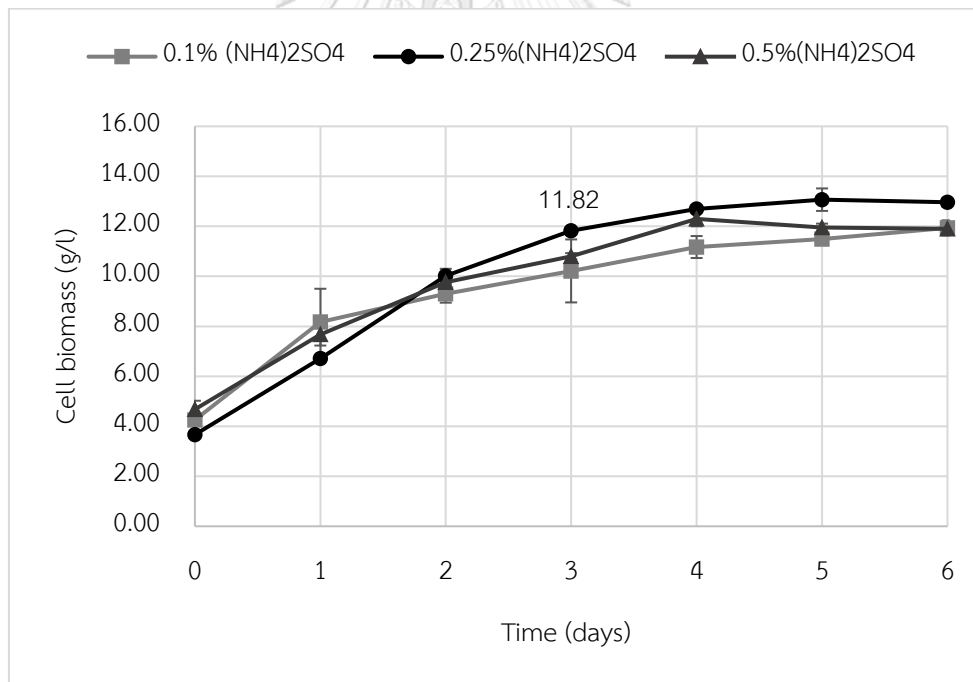
น้ำมันเท่ากับ 1.28 กรัม/ลิตร/วัน) (ภาพที่4-12) ที่สภาวะนี้เซลล์ยังมีการสะสมน้ำมันในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 32.57% (กรัม/กรัม) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 11.82 กรัม/ลิตรด้วย (ภาพที่ 4-13 และ 4-14) *Rhodospiridium toruloides* Y4 ที่เจริญในอาหารที่มีฟอสฟอรัสจำกัด ผลิตและสะสมน้ำมันได้สูงที่สุดเท่ากับ 12.1 กรัม/ลิตร โดยมีอัตราการผลิตน้ำมันเท่ากับ 3.01 กรัม/ลิตร/วัน ปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์ 62.2% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง (Wu และคณะ, 2010) *Trichosporonoides spathulata* และ *Kodamaea ohmeri* เจริญและผลิตน้ำมันได้สูงที่สุดเมื่อเติม 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารผลิตน้ำมัน ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่า 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ยีสต์ทั้งสองชนิดมีการเจริญและผลิตน้ำมันได้น้อยลง (Kitcha และCheirsilp, 2011) การเลี้ยง *Rhodotorula glutinis* TR29 ในกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0-6 กรัม/ลิตร พบว่า *R. glutinis* TR29 ผลิตน้ำมันได้สูงที่สุดในกากน้ำตาลที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัม/ลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 14.94) ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตสูงกว่า 4 กรัม/ลิตร การผลิตน้ำมันลดลง แต่น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น โดยน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงที่สุดเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นเท่ากับ 6 กรัม/ลิตร (Taskin และคณะ, 2016)



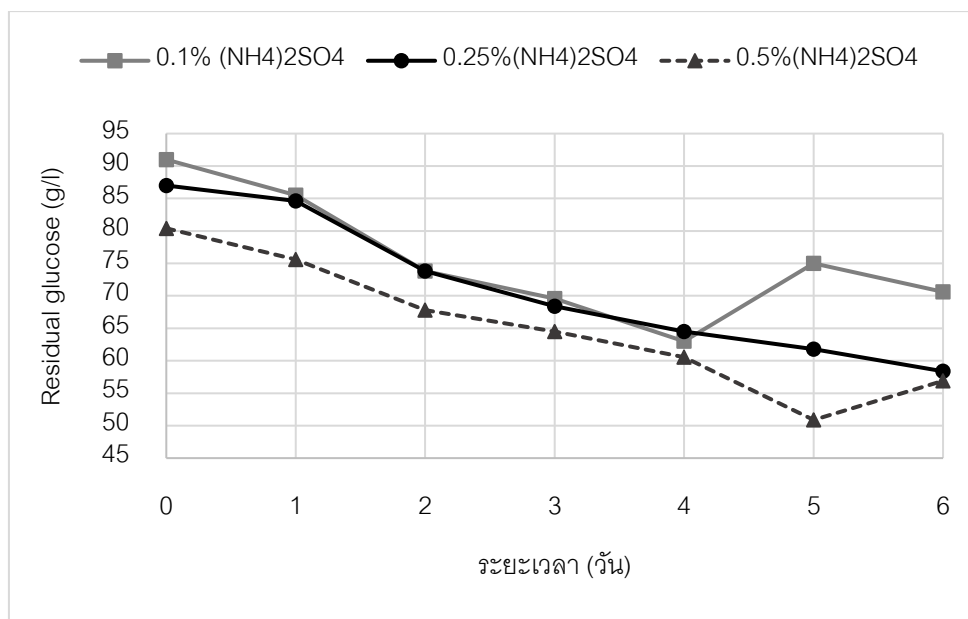
ภาพที่ 4-12 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม (NH₄)₂SO₄ ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4-13 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม (NH₄)₂SO₄ ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4-14 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงใน DCSH ที่เติม (NH₄)₂SO₄ ความเข้มข้นต่าง ๆ

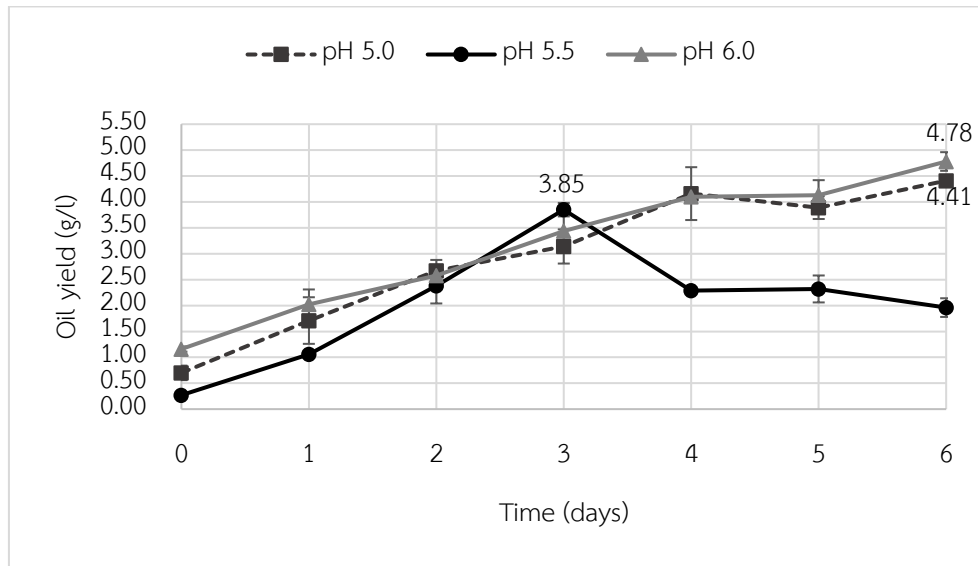


ภาพที่ 4-15 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม (NH₄)₂SO₄ ความเข้มข้นต่าง ๆ

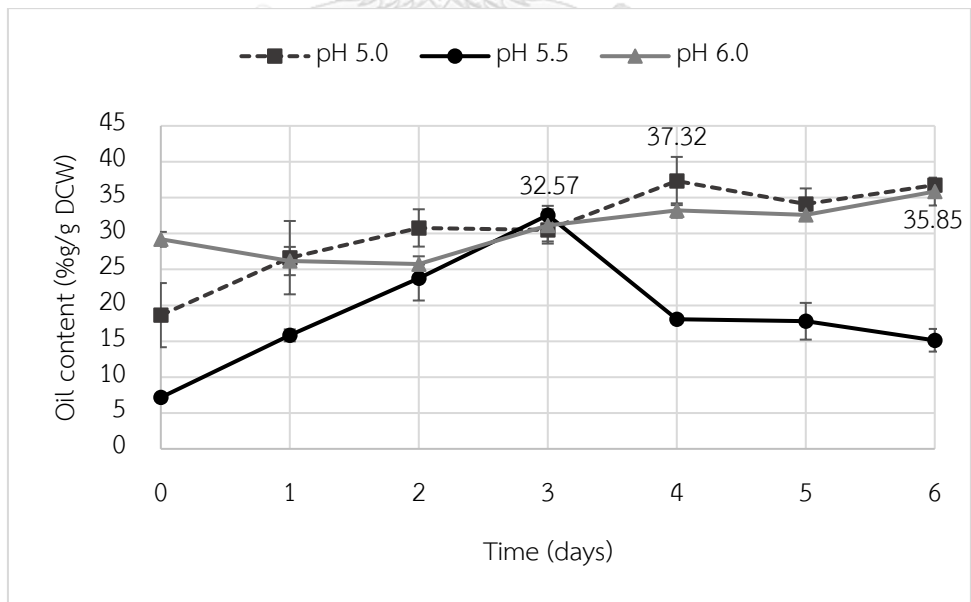
4.7.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของ DCSH ต่อการผลิตน้ำมัน

ผลของการเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 5.5 และ 6.0 พบว่าที่พีเอช 6.0 *P. tsukubaensis* YWT7-2 ผลิตน้ำมันได้สูงที่สุด 4.78 กรัม/ลิตร แต่มีอัตราเร็วของการผลิตน้ำมันเพียง 0.80 กรัม/ลิตร/วัน ในขณะที่ที่พีเอช 5.5 แม้ว่าจะได้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดเพียง 3.85 กรัม/ลิตร แต่อัตราเร็วของการผลิตน้ำมันสูงกว่าที่พีเอช 6.0 ถึง 1.6 เท่า หรือเท่ากับ 1.28 กรัม/ลิตร/วัน (ภาพที่ 4-16) ที่พีเอช 5.5 เมื่อผลผลิตน้ำมันเท่ากับ 3.85 กรัม/ลิตร ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เท่ากับ 32.57% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 4-17) น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 11.82 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4-18) El-Fadaly และคณะ (2009) รายงานว่า *Cryptococcus curvatus* NRRLY ผลิตและสะสมน้ำมันได้สูงที่สุด (1.7 กรัม/ลิตร) ที่พีเอช 5.5 *Rhodotorula glutinis* เจริญและผลิตน้ำมันในน้ำเสียจากการผลิตผงชูรสได้สูงที่สุดที่พีเอช 5.5 (Xue และคณะ, 2008) *Rhodotorula kratochilovae* SY89 เจริญและผลิตน้ำมันได้มากที่สุดในอาหารที่มีไนโตรเจนจำกัดที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 (Jiru และคณะ, 2017)) ในขณะที่ *Rhodotorula glutinis* IIP-30 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด จะผลิตน้ำมันและเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.0 (Johnson และคณะ, 1992) พีเอชมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ (Yong-Hong และคณะ, 2006)

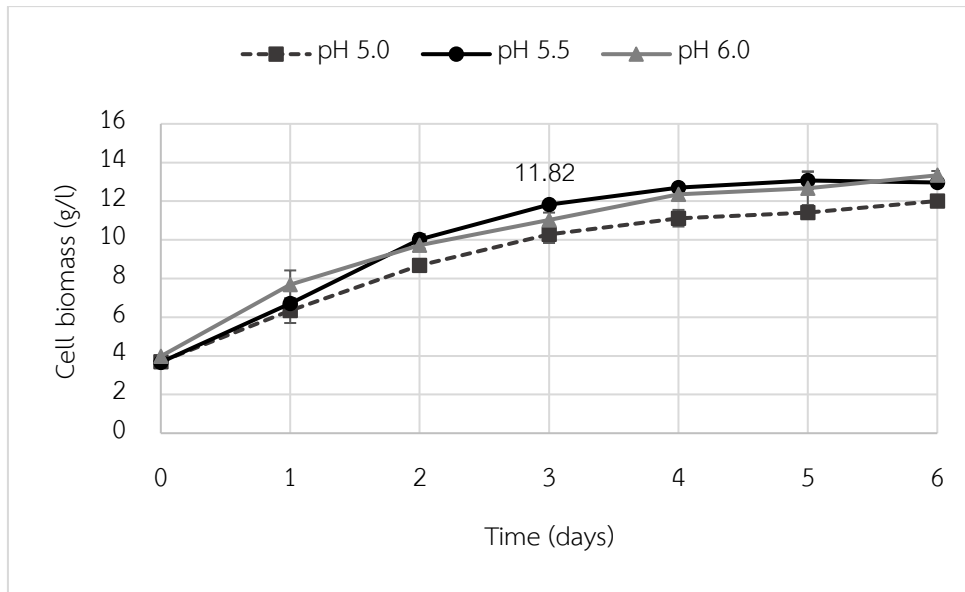
จากผลการทดลองข้างต้น เลือก DCSH ซึ่งเติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต พีเอชเริ่มต้น 5.5 ไปใช้สำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ในการทดลองต่อไป



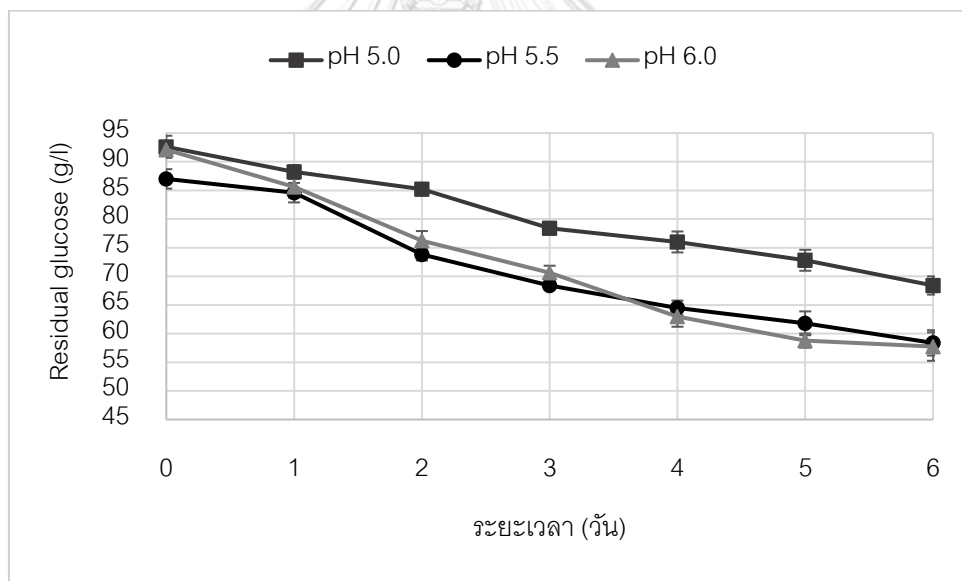
ภาพที่ 4-16 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4-17 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4-18 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 เมื่อเพาะเลี้ยงใน DCSH เต็ม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4-19 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เต็ม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ

4.8 ผลของการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ซึ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพลีเทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

จากผลการทดลองเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันใน CSH และ DCSH พบว่า *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เพาะเลี้ยงใน DCSH มีการเจริญสูงกว่าใน CSH (ภาพที่4-5) การทดลองนี้จึงเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เพิ่มจำนวนใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพลีเทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ซึ่งนำมาเพาะเลี้ยงใน DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต พีเอชเริ่มต้น 5.5 ในขั้นตอนการผลิตน้ำมัน

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์: *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เพิ่มจำนวนใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพลีเทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพิ่มจำนวนเซลล์ได้เร็วกว่าที่เพาะเลี้ยงใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต โดยได้ค่าความขุ่นเซลล์ที่ 660 นาโนเมตรเป็น 2.41 ในขณะที่ได้ค่าความขุ่นเซลล์ใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตเพียง 2.03

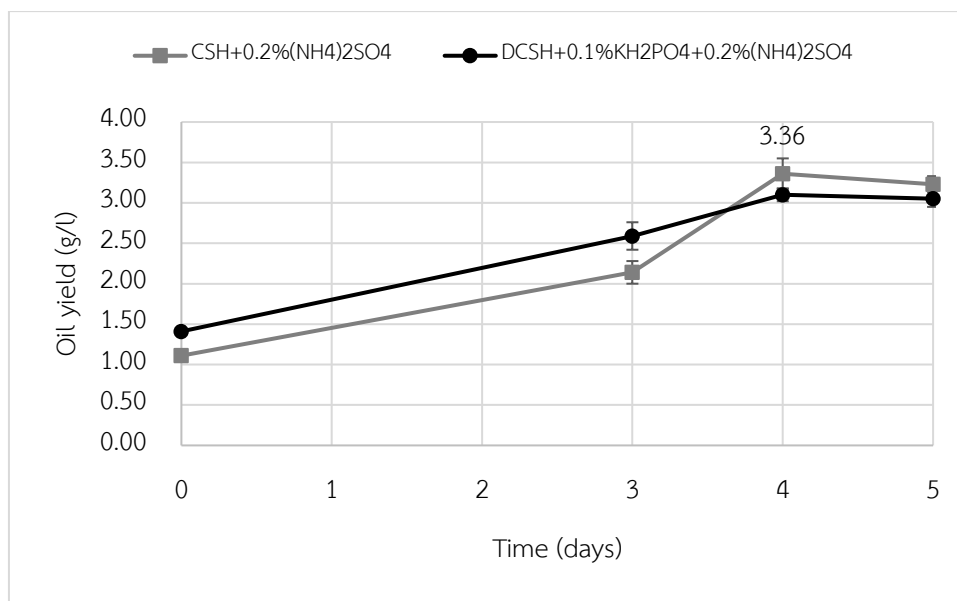
ขั้นตอนการผลิตน้ำมัน: ปรับค่าความขุ่นเซลล์ที่เพิ่มจำนวนใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพลีเทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตลงมาเท่ากับเซลล์ที่เพิ่มจำนวนใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วเพาะเลี้ยงต่อใน DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อผลิตน้ำมัน

ผลการผลิตน้ำมันพบว่า *P. tsukubaensis* YWT7-2 เมื่อเพิ่มจำนวนใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต ผลิตน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 3.36 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4-20) คิดเป็นอัตราการผลิตน้ำมันเท่ากับ 0.84 กรัม/ลิตร/วัน และมีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุดเท่ากับ 32.28% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 4-21) สูงกว่าเซลล์ที่เพิ่มจำนวนใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพลีเทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แต่ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (10.42 กรัม/ลิตร) ต่ำกว่าเซลล์ที่เพิ่มจำนวนใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

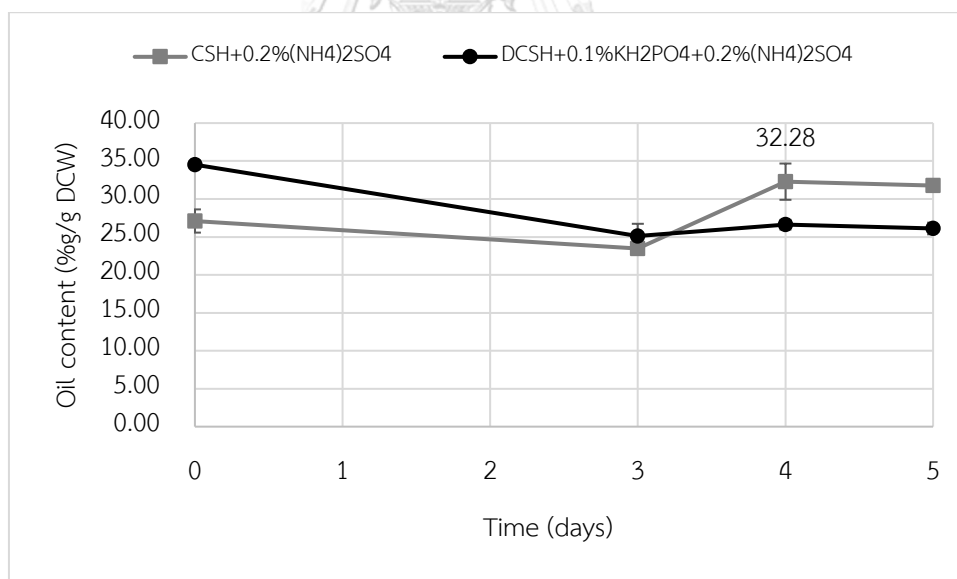
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เพิ่มจำนวนใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตได้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด 3.10 กรัม/ลิตร ในวันที่ 4 คิดเป็นอัตราการผลิตน้ำมัน 0.78 กรัม/ลิตร/วัน ในวันที่มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์สูงสุด 26.61% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง ต่ำกว่าเซลล์ที่เพิ่มจำนวนใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต แต่เซลล์ที่เพิ่มจำนวนใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด โดยน้ำหนักเซลล์แห้งในวันที่ 4 เท่ากับ 11.66 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4-22) สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Griffiths และ Harrison, 2009) โดยที่สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเจริญ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อหรือสภาวะเครียดจะส่งผลต่อปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ (Breuer และคณะ, 2012; Khozin-Goldberg และ Cohen, 2006)

แม้ว่าเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เพิ่มจำนวนใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จะมีอัตราการผลิตน้ำมันต่ำกว่าเซลล์ที่เพิ่มจำนวนใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต แต่ *P. tsukubaensis* YWT7-2 สามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าทั้งในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์ และขั้นตอนการผลิตน้ำมัน

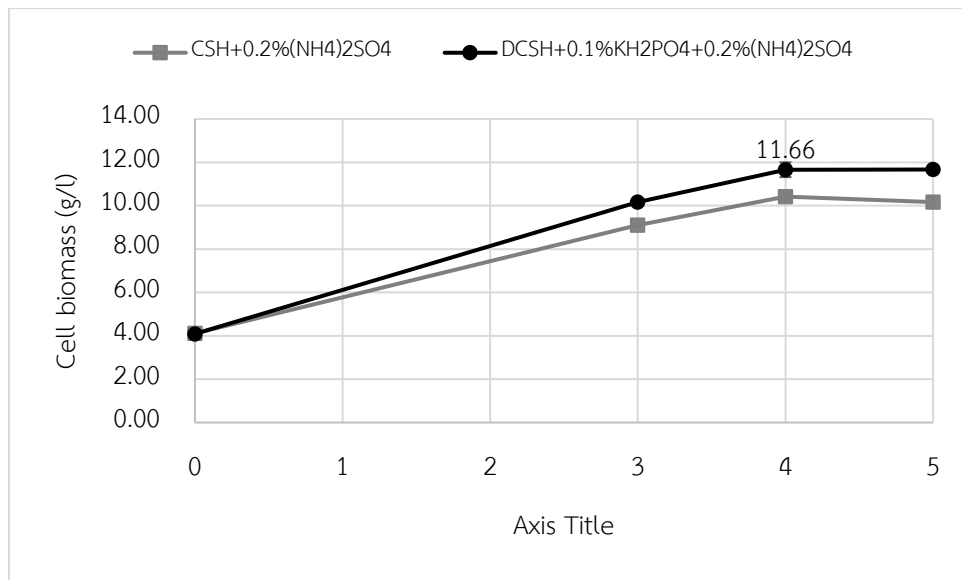
จึงได้หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เติมลงใน DCSH ที่มี 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วทดลองนำเซลล์ที่ได้ทั้งหมดไปหาปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้



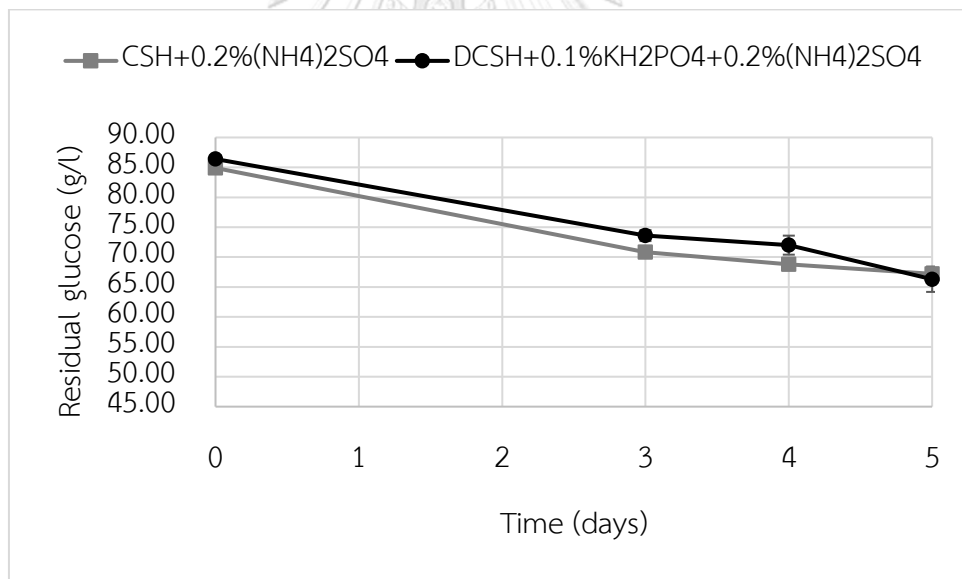
ภาพที่ 4-20 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ หรือ DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) KH₂PO₄ ผลิตน้ำมันใน DCSH เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ พีเอช 5.5



ภาพที่ 4-21 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ หรือ DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) KH₂PO₄ ผลิตน้ำมันใน DCSH เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ พีเอช 5.5



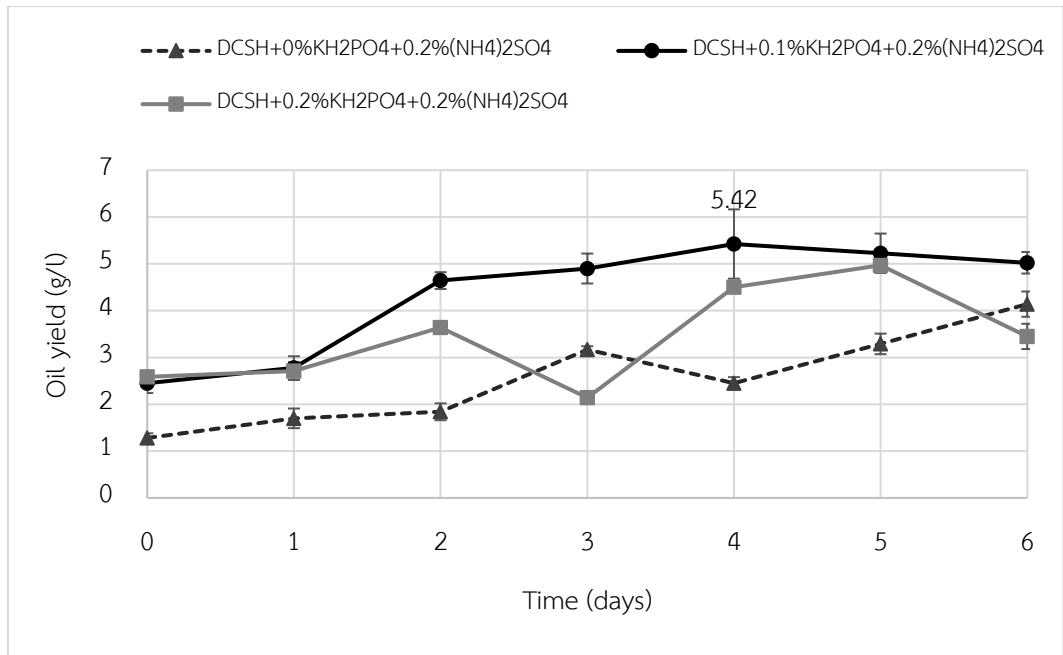
ภาพที่ 4-22 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เพิ่มจำนวนใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ หรือ DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) KH₂PO₄ ผลิตน้ำมันใน DCSH เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ พีเอช 5.5



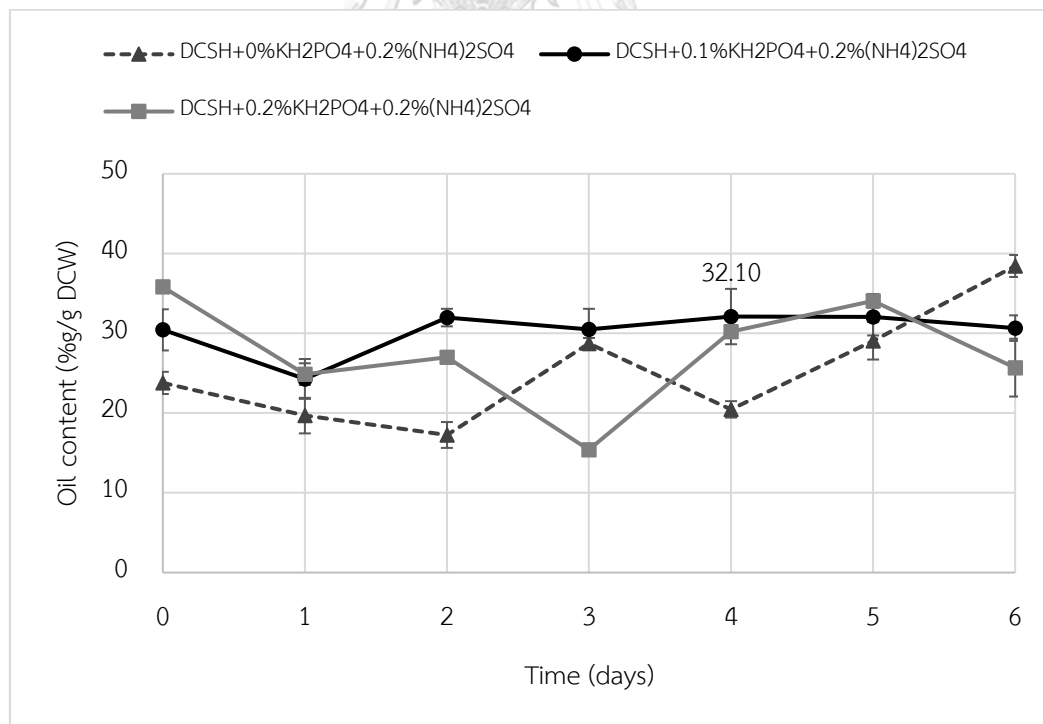
ภาพที่ 4-23 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน CSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ หรือ DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) KH₂PO₄ ผลิตน้ำมันใน DCSH เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (NH₄)₂SO₄ พีเอช 5.5

4.9 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เมื่อเติมร่วมกับ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตใน DCSH ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์

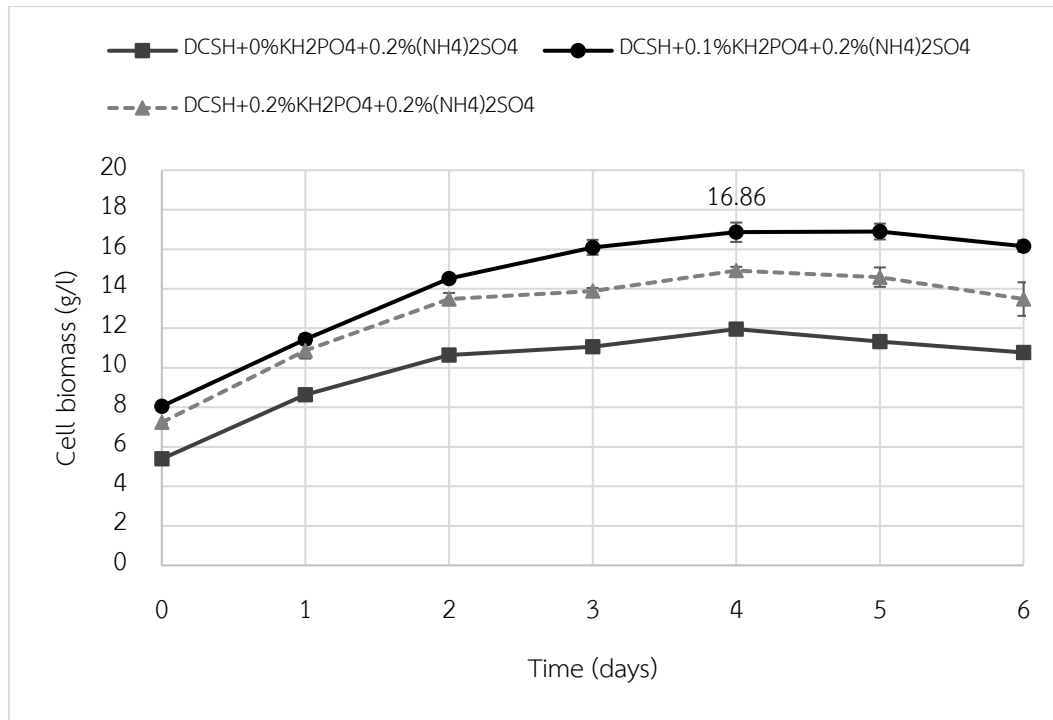
ผลการเพิ่มจำนวนเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม 0, 0.1 และ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร่วมกับ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำเซลล์ที่ได้ทั้งหมดมาผลิตน้ำมัน โดยแขวนลอยเซลล์ใน DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต พีเอชเริ่มต้น 5.5 พบว่า *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เพิ่มจำนวนใน DCSH ที่เติม 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร่วมกับ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 5.42 กรัม/ลิตร ที่วันที่ 4 คิดเป็นอัตราการผลิตน้ำมันเท่ากับ 1.36 กรัม/ลิตร/วัน (ภาพที่ 4-24) ที่สภาวะนี้มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เท่ากับ 32.10% (กรัม/กรัม) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 4-25) และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 16.86 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 4-26) การปรับค่าพีเอชใน DCSH ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ นอกจากทำให้ soluble salt ในไฮโดรไลเสตตกตะกอนแล้ว ยังทำให้ปริมาณฟอสเฟตลดลง เนื่องจากแคลเซียมไอออนสามารถจับกับฟอสเฟต แล้วเกิดเป็นตกตะกอน (Liu และคณะ, 2008) ฟอสเฟตจึงถูกกำจัดออกจากไฮโดรไลเสต การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตลงใน DCSH จึงเป็นการเพิ่มปริมาณฟอสเฟตให้แก่ยีสต์เพื่อนำไปใช้ในการเจริญ Hosni และคณะ (2018) กำจัดฟอสเฟตออกจากน้ำเสียสังเคราะห์โดยการตกตะกอนด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเมื่ออัตราส่วนของแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสเท่ากับ 2.07 สามารถตกตะกอนฟอสเฟตออกจากน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 98% ในเวลา 30 นาที Chen และคณะ (2012) รายงานว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถกำจัดฟอสฟอรัสออกจากน้ำเสียสังเคราะห์และแม่น้ำได้



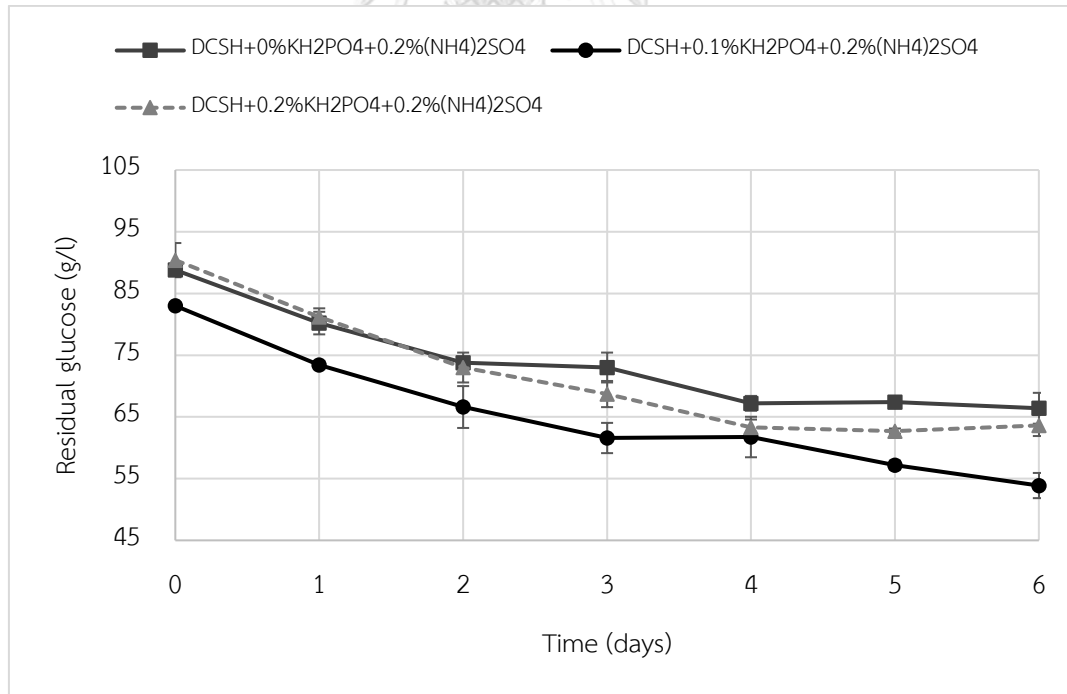
ภาพที่ 4-24 ผลผลิตน้ำมันที่ได้ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 ร่วมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผลิตน้ำมันใน DCSH เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5



ภาพที่ 4-25 ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 ร่วมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผลิตน้ำมันใน DCSH เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5



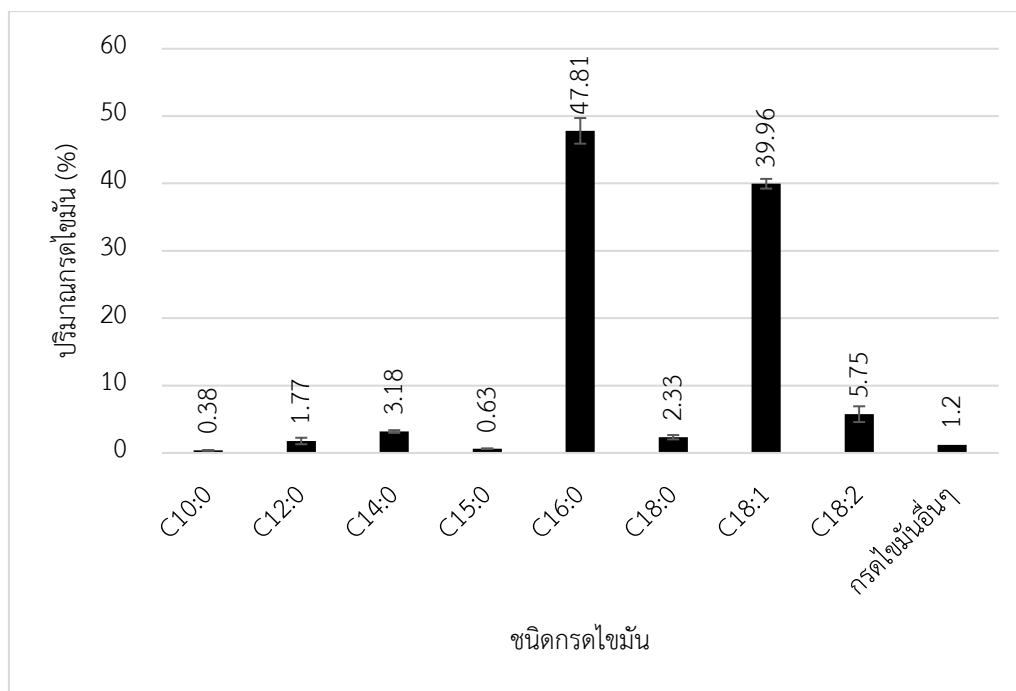
ภาพที่ 4-26 น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 ร่วมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผลิตน้ำมันใน DCSH เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5



ภาพที่ 4-27 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ใน DCSH ที่เติม KH_2PO_4 ร่วมกับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผลิตน้ำมันใน DCSH เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พีเอช 5.5

4.10 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเมื่อผลิตน้ำมันใน DCSH

ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เพิ่มจำนวนใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และผลิตน้ำมันใน DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต พีเอช 5.5 (ภาพที่ 4-28) พบว่ามีกรดปาล์มิติกสูงสุด 47.81% รองลงมาคือ กรดโอเลอิก 36.96% ของกรดไขมันทั้งหมด Li และคณะ (2010) รายงานว่า กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในน้ำมันยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง คือ กรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติกมากกว่า 85.8% โดยเป็นกรดโอเลอิกถึง (63.5%) Wang และคณะ (2012) รายงานว่า กรดไขมันมากกว่า 96.8% ที่พบในน้ำมันยีสต์ *R. toruloides* 21167 ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 8.0% เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอนจำนวน 16 และ 18 อะตอม โดยพบกรดโอเลอิกมากที่สุด Gen และคณะ (2014) รายงานว่า กรดไขมันมากกว่า 96% ที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันยีสต์ *R. toruloides* 21167 ที่เพาะเลี้ยง *R. toruloides* 21167 ร่วมกับยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ที่ถูกตรึงเพื่อทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งมันสำปะหลัง เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอนจำนวน 16 และ 18 อะตอม เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันยีสต์ที่ผลิตในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน (ภาพที่ 4-3) พบว่ากรดปาล์มิติกมีปริมาณเพิ่มขึ้น 1.3 เท่า ส่วนกรดโอเลอิก กรดสเตียริก และกรดลิโนเลอิกมีปริมาณลดลง 1.03, 3.03 และ 3.33 เท่าตามลำดับ องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ (ตารางที่ 4-3) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 ที่เพาะเลี้ยงใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน พบว่า ปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวสูงกว่า (คือ 56.1% และ 46.2%) แต่ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำกว่า (คือ 42.71% และ 50.05%) ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูงแต่กรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำ จะมีค่าซีเทน (cetane number) สูง (Sitepu และคณะ, 2014) ไบโอดีเซลที่มีค่าซีเทนสูงจะทำให้เครื่องยนต์สามารถจุดระเบิดได้ในระยะเวลาสั้น ระบบการเผาไหม้ของเครื่องยนต์จึงสามารถทำงานได้อย่างรวดเร็ว (Atabani และคณะ, 2012) ไบโอดีเซลมีค่าความคงตัวออกซิเดชัน (oxidative stability) สูง จึงมีความเสถียรสูง (Sitepu และคณะ, 2014) น้ำมันของยีสต์ชนิดเดียวกันแต่เพาะเลี้ยงในอาหารต่างชนิดกัน กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักจะแตกต่างกัน (Woodbine, 1959)



ภาพที่ 4-28 ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน เมื่อเพาะเลี้ยง *P. tsukubaensis* YWT7-2 ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับด่างเกิน

สายพันธุ์ยีสต์	อาหารผลิต น้ำมัน	กรดไขมัน											อ้างอิง		
		กรดพวริก (C10:0)	กรดลอริก (C12:0)	กรดไมริสติก (C14:0)	กรดปาล์มติก (C16:0)	กรดปาล์มไมโทเลอิก (C16:1)	กรดสเตียริก (C18:0)	กรดโอเลอิก (C18:1)	กรดไลโนเลอิก (C18:2)	กรดไลโนเลนิก (C18:3)	กรดอะราคิติก (C20:0)	กรดเบฮนิก (C22:0)		กรดไขมันชนิดอื่นๆ	
	กรดอะซีติก														2009
<i>R. toruloides</i> Y4	อาหารผสมผลิต น้ำมัน (CN=80)+HMF			1.4	27.7	0.6	11.2	53.3	4.5	0.8	-	-	-	-	Hu และคณะ, 2009
<i>R. toruloides</i> DEBB 5533	น้ำอ้อย			1	21.5	0.7	4.6	62.1	7.6	0.7	0.4	0.3	0.7	Soccol และ คณะ, 2017	
<i>R. toruloides</i>	โซเดียมดีไฮด์ซัลไฟฟ เฟนต			1.6	27.5	3.1	11.9	44.2	9.5	2.3	-	-	-	Xu และคณะ 2015	
<i>R. toruloides</i>	กลีเซอรอล + โซเดียมคโคโรไรด์ไม่ บริสุทธิ์			1.2	25.9	0.9	12.1	46.3	11.7	2	-	-	-	Xu และคณะ 2012	
<i>R. toruloides</i>	กลีเซอรอล+เมทา			1.3	25.4	2.3	12.6	45.4	11.3	1.8	-	-	-	Xu และคณะ	

สายพันธุ์ยีสต์	อาหารผลิต น้ำมัน	กรดไขมัน											อ้างอิง			
		กรดคาร์บอริก (C10:0)	กรดลอริก (C12:0)	กรดไมริสติก (C14:0)	กรดปาล์มติก (C16:0)	กรดปาล์มอเลอิก (C16:1)	กรดสเตียริก (C18:0)	กรดโอเลอิก (C18:1)	กรดไลโนเลอิก (C18:2)	กรดไลโนเลนิก (C18:3)	กรดอะราคิติก (C20:0)	กรดเบฮนิก (C22:0)		กรดไขมันชนิดอื่นๆ		
	นอตไม่บริสุทธิ์															2012
<i>R. toruloides</i>	กาลีเซอรอล+ โซเดียมโอเลต เอตไม่บริสุทธิ์	1.6		272	2.1	12.1	44.1	11.3	1.6	-	-	-				Xu และคณะ 2012
<i>R. toruloides</i>	กาลีเซอรอล+เมทิล โอดีเอตไม่บริสุทธิ์	1.7		252	3.2	108	43.1	13.4	2.6	-	-	-				Xu และคณะ 2012
<i>R. toruloides</i>	กาลีเซอรอล+ กาลีเซอรอลโมโนโอเลต เอตไม่บริสุทธิ์	1.6		235	3.5	11	47.1	11	2.3	-	-	-				Xu และคณะ 2012
<i>R. fluviale</i> DMKU- RK253	กาลีเซอรอลดีบี+ อาหารเหลว YM	0.7		178	5.1	31.1	26.8	7.9								Polburee และ คณะ, 2016

สายพันธุ์เชื้อสดี	อาหารผลิต น้ำมัน	กรดไขมัน												อ้างอิง	
		กรดวาหริก (C10:0)	กรดลอริก (C12:0)	กรดไมริสติก (C14:0)	กรดปาล์มติก (C16:0)	กรดปาล์มอิลิก (C16:1)	กรดสเตียริก (C18:0)	กรดโอเลอิก (C18:1)	กรดไลโนเลอิก (C18:2)	กรดไลโนเลนอิก (C18:3)	กรดอะราคดิก (C20:0)	กรดเบฮนิก (C22:0)	กรดไขมันชนิดอื่น ๆ		
<i>R. fluviale</i> DMKU-SP314	กลูโคส+ไฮโดส			1.3	252	0.8	11.1	402	17.9	33					Poontawe และคณะ, 2017
<i>R. albobovatum</i> (08-225)	น้ำตาลจากการย่อยแป้ง 100%			14.3	1.6		4.6	66.6	2.7				3.5		Luque และคณะ, 2016
<i>R. kratochvilovae</i> HIMPAL	สารสกัดจากผลราชพฤกษ์			0.78	43.06		28.74	17.34	0.48						Patel และคณะ, 2015
<i>R. kratochvilovae</i> HIMPAL	น้ำผึ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ				21.86		0.5	45.43	15.91			0.12			Patel และคณะ, 2017
<i>Rhodotorula glutinis</i>	ไฮโดรไลเสตฟางข้าวสาลีที่กำจัด			-	224	-	9.3	42.7	17	-	-	-	-		YU และคณะ, 2011

สายพันธุ์ยีสต์	อาหารผลิต น้ำมัน	กรดไขมัน												อ้างอิง
		กรดคาร์บอริก (C10:0)	กรดลอริก (C12:0)	กรดไมริสติก (C14:0)	กรดปาล์มติก (C16:0)	กรดปาล์มไมโตเลอิก (C16:1)	กรดสเตียริก (C18:0)	กรดโอเลอิก (C18:1)	กรดไลโนเลอิก (C18:2)	กรดไลโนเลนิก (C18:3)	กรดอะราคิติก (C20:0)	กรดเบฮนิก (C22:0)	กรดไขมันชนิดอื่นๆ	
<i>R. glutinis</i>	สารยับยั้งการเจริญ ไฮโดรไลสเฟทฟาง ข้าวสาลี	-	-	235	-	9	434	154	-	-	-	-	-	YU และคณะ 2011
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	กรดไขมันระเหย ง่าย	-	-	132	-	22.62	50.72	112	0.89	-	-	-	-	Xu และคณะ, 2015
<i>C. curvatus</i>	ไฮโดรไลสเฟทฟาง ข้าวสาลี	-	-	259	-	152	47.7	6.42	-	-	-	-	-	YU และคณะ 2011
<i>C. curvatus</i>	ไฮโดรไลสเฟทฟาง ข้าวสาลีที่กำจัด สารยับยั้งการ เจริญ	-	-	27	-	15.3	45	7.3	-	-	-	-	-	YU และคณะ 2011

สายพันธุ์ยีสต์	อาหารผลิตน้ำมัน	กรดไขมัน												อ้างอิง		
		กรดพวริก (C10:0)	กรดลอริก (C12:0)	กรดไมริสติก (C14:0)	กรดปาล์มติก (C16:0)	กรดปาล์มอิลิก (C16:1)	กรดสเตียริก (C18:0)	กรดโอเลอิก (C18:1)	กรดลิโนลอลิก (C18:2)	กรดลิโนเลนิก (C18:3)	กรดอะราคิติก (C20:0)	กรดเบฮนิก (C22:0)	กรดไขมันชนิดอื่นๆ			
<i>Yarrowia lipolytica</i>	ไฮโดรไลเสตฟางข้าวสาลี	-	-	-	6	-	2	56	19.9	-	-	-	-	-	-	YU และคณะ 2011
<i>Y. lipolytica</i>	ไฮโดรไลเสตฟางข้าวสาลีที่กำจัดสารยับยั้งการเจริญ	-	-	-	5.7	-	0.8	55.3	20.9	-	-	-	-	-	-	YU และคณะ 2011
<i>Lipomyces starkyei</i> ATCC 56304	เพิ่มจำนวนเซลล์ในกลูโคสผลิตน้ำมันในไฮโดส	-	-	-	21	3.1	6	64.7	3.1	0.9	-	-	-	-	-	Probst และคณะ, 2017
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> YWT 7-2	อาหารเหลวผลิตน้ำมัน (CN=62.5)	-	-	247	36.66	4.34	7.07	37.94	7.77	-	-	-	-	-	3.75	งานวิจัยนี้
<i>P. tsukubaensis</i>	DCSH+0.25%	0.38	1.77	3.18	47.81	-	2.33	36.96	5.75	-	-	-	-	-	1.2	งานวิจัยนี้

สายพันธุ์ยีสต์	อาหารผลิต น้ำมัน	กรดไขมัน	อ้างอิง
YWT 7-2	(น้ำคั้น/ปริมมาตร) แอมโมเนียซัลเฟต	กรดคาพริก (C10:0) กรดลอริก (C12:0) กรดไมริสติก (C14:0) กรดปาล์มติก (C16:0) กรดปาล์มไมเทอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) กรดลิโนเลอิก (C18:2) กรดลิโนเลนิก (C18:3) กรดอะราคิติก (C20:0) กรดเบฮนิก (C22:0) กรดไขมันชนิดอื่นๆ	



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำยีสต์ทั้งหมดจำนวน 28 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี มาย้อมด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ในสเตรต แล้วตรวจดูหยดน้ำมันภายในเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อดูปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์เบื้องต้น พบว่ามียีสต์จำนวน 8 สายพันธุ์ที่มีขนาดหยดน้ำมันภายในเซลล์ประมาณสามในสี่ส่วนของเซลล์ ได้แก่ *C. visivanathii* YMTW 12-2, *D. vanrijiae* จำนวน 3 สายพันธุ์ (NS 4-2, SFL 10-1 และ SFL 17-2SF) *Geotrichum* sp. SRM 6-1, *K. ohmeri* NS 9-1, *P. tsukubaensis* YWT 7-2 และ *R. toruloides* FRL 2-4 ผลการนำยีสต์ 8 สายพันธุ์นี้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมันที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 62.5 เป็นเวลา 6 วัน พบว่ายีสต์ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 เป็นยีสต์น้ำมัน มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เท่ากับ 31.36% (กรัม/กรัม) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ให้ผลผลิตน้ำมันเท่ากับ 3.08 กรัม/ลิตร การสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ไม่สามารถแยกออกจากการเจริญในบางครั้งได้ เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT 7-2 ใน DCSH ที่เติม 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และผลิตน้ำมันใน DCSH ที่เติม 0.25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ยีสต์สามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้สูงที่สุดเท่ากับ 5.42 กรัม/ลิตร ในวันที่ 4 คิดเป็นอัตราการผลิตน้ำมันเท่ากับ 1.36 กรัม/ลิตร/วัน น้ำมันยีสต์ที่ผลิตได้มีชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ กรดปาล์มมิก กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก และกรดสเตียริก ซึ่งคล้ายกับกรดไขมันหลักที่พบในน้ำมันพืช จึงใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นน้ำมันยีสต์ *P. tsukubaensis* YWT7-2 จึงเหมาะที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเป็นไบโอดีเซล

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กล้าณรงค์ ศรีรอด and เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. (2546). เทคโนโลยีแป้ง. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เจริญศักดิ์ โจรนฤทธิพิเชษฐ์. (2560). ฐานข้อมูลวิจัยมันสำปะหลัง ค้นหาจาก

http://kasetinfo.arda.or.th/arda/cassava/?page_id=206

ธนาพร พลศักดิ์. (2557). การหาค่าเหมาะที่สุดของแหล่งไนโตรเจนสำหรับการหมักเอทานอลแบบบีเอช จีจากแป้งมันสำปะหลัง. (ปริญญาโทบริหารธุรกิจ), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,

ประภาส ช่างเหล็ก, สุตประสงค์ สุวรรณเลิศ and สกล ฉายศรี. (2560, 12 กุมภาพันธ์ 2562). มันสำปะหลัง” เพื่ออาหารและพลังงานทดแทนของโลก ค้นหาจาก

http://www3.rdi.ku.ac.th/exhibition/52/04-plant/prapart/plant_00.html

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. (2562, 12 กุมภาพันธ์ 2562). ค้นหาจาก

<https://www.tapiocathai.org/C.html>

ภาษาอังกฤษ

Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P. and Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(4), 1219-1227.

Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., De Lucia, M., Leonardi, A. and Rossi, M. (2010). Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 73.

Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M. and Guebitz, G. (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 99(8), 3051-3056.

Atabani, A. E., Silitonga, A. S., Badruddin, I. A., Mahlia, T., Masjuki, H. and Mekhilef, S. (2012). A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2070-2093.

Babij, T., Moss, F. and Ralph, B. (1969). Effects of oxygen and glucose levels on lipid

- composition of yeast *Candida utilis* grown in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 11(4), 593-603.
- Bao, R., Wu, X., Liu, S., Xie, T., Yu, C. and Lin, X. (2018). Efficient conversion of fructose-based biomass into lipids with *Trichosporon fermentans* under phosphate-limited conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(1), 113-123.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribe Larrea, J. L., Molina-Jouve, C. and Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48(6), 375-387.
- Beopoulos, A., Mrozova, Z., Thevenieau, F., Le Dall, M. T., Hapala, I., Papanikolaou, S., Chardot, T. and Nicaud, J. M. (2008). Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7779-7789.
- Beopoulos, A., Nicaud, J. M. and Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(4), 1193-1206.
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B. and Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124, 217-226.
- Breuninger, W. F., Piyachomkwan, K. and Sriroth, K. (2009). Tapioca/cassava starch: production and use. In *Starch* (pp. 541-568): Elsevier.
- Chen, B., Qu, R., Shi, J., Li, D., Wei, Z., Yang, X. and Wang, Z. (2012). Heavy metal and phosphorus removal from waters by optimizing use of calcium hydroxide and risk assessment. *Environmental Pollution*, 1(1), 38.
- Chen, X. F., Huang, C., Yang, X. Y., Xiong, L., Chen, X. D. and Ma, L. L. (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.
- Choi, S., Ryu, D. D. and Rhee, J. S. (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(5), 1165-1172.
- Deeba, F., Pruthi, V. and Negi, Y. S. (2017). Fostering triacylglycerol accumulation in novel oleaginous yeast *Cryptococcus psychrotolerans* IITRFD utilizing groundnut

- shell for improved biodiesel production. *Bioresource Technology*, 242, 113-120.
- Demirbas, A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50(1), 14-34.
- El-Fadaly, H., El-Ahmady, N. and Marvan, E. (2009). Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. *Research Journal of Microbiology*, 4(8), 301-313.
- Eroshin, V. and Krylova, N. (1983). Efficiency of lipid synthesis by yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(7), 1693-1700.
- Evans, C. T. and Ratledge, C. (1984). Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Journal of General Microbiology*, 130(7), 1693-1704.
doi:10.1099/00221287-130-7-1693
- Fai, A. E. C., da Silva, J. B., de Andrade, C. J., Bution, M. L. and Pastore, G. M. (2014). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 343-350.
- Fai, A. E. C., Simiqueli, A. P. R., de Andrade, C. J., Ghiselli, G. and Pastore, G. M. (2015). Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: an integrated process. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 535-542.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D. and Compagno, C. (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*, 111, 398-403.
- Gao, R., Li, Z., Zhou, X., Cheng, S. and Zheng, L. (2017). Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* culture with synthetic and food waste-derived volatile fatty acids for lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 247.
- Garay, L. A., Sitepu, I. R., Cajka, T., Chandra, I., Shi, S., Lin, T., German, J. B., Fiehn, O. and Boundy-Mills, K. L. (2016). Eighteen new oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(7), 887-900.

- Gen, Q., Wang, Q. and Chi, Z.-M. (2014). Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and immobilized amylases-producing yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *Renewable Energy*, 62, 522-526.
- Golubev, W. I., Pfeiffer, I. and Golubeva, E. W. (2006). Mycocin production in *Pseudozyma tsukubaensis*. *Mycopathologia*, 162(4), 313-316.
- Griffiths, M. J. and Harrison, S. T. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493-507.
- Helwani, Z., Othman, M., Aziz, N., Fernando, W. and Kim, J. (2009). Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: a review. *Fuel Processing Technology*, 90(12), 1502-1514.
- Holdsworth, J. E., Veenhuis, M. and Ratledge, C. (1988). Enzyme activities in oleaginous yeasts accumulating and utilizing exogenous or endogenous lipids. *Journal of General Microbiology*, 134(11), 2907-2915.
- Hosni, K., Moussa, S. B., Chachi, A. and Amor, M. B. (2008). The removal of PO₄³⁻ by calcium hydroxide from synthetic wastewater: optimisation of the operating conditions. *Desalination*, 223(1-3), 337-343.
- Hu, C., Zhao, X., Zhao, J., Wu, S. and Zhao, Z. K. (2009). Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 100(20), 4843-4847.
- Huang, C., Chen, X. F., Xiong, L., Ma, L. L. and Chen, Y. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology Advances*, 31(2), 129-139.
- Huang, C., Zong, M. H., Wu, H. and Liu, Q. P. (2009). Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology*, 100(19), 4535-4538.
- Husain, S. S. and Hardin, M. (1952). Influence of carbohydrate and nitrogen sources upon lipid production by certain yeasts. *Food Research*, 17, 60-66.
- Jernejc, K. and Legiša, M. (2002). The influence of metal ions on malic enzyme activity and lipid synthesis in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, 217(2), 185-

190.

- Jeya, M., Lee, K. M., Tiwari, M. K., Kim, J. S., Gunasekaran, P., Kim, S. Y., Kim, I. W. and Lee, J. K. (2009). Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(2), 225-231.
- Jiru, T. M., Groenewald, M., Pohl, C., Steyn, L., Kiggundu, N. and Abate, D. (2017). Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodosporidium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. *3 Biotech*, 7(2), 145.
- Johnson, V., Singh, M., Saini, V., Sista, V. and Yadav, N. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 382-384.
- Jönsson, L. J., Alriksson, B. and Nilvebrant, N.-O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 16.
- Khozin-Goldberg, I. and Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696-701.
- Kimura, K., Yamaoka, M. and Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 331-338.
- Kitcha, S. and 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. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22, 366.
- Kolouchová, I., Maťátková, O., Sigler, K., Masák, J. and Řezanka, T. (2016). Production of palmitoleic and linoleic acid in oleaginous and nonoleaginous yeast biomass. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2016.
- Koutinas, A. A. and Papanikolaou, S. (2011). Biodiesel production from microbial oil. In *Handbook of Biofuels Production* (pp. 177-198). Amsterdam, Netherlands:

elsevier.

- Kraisintu, P., Yongmanitchai, W. and Limtong, S. (2010). Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospordium toruloides* DMKU3-TK16. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 44, 436-445.
- Kunthiphun, S., Chokreansukchai, P., Hondee, P., Tanasupawat, S. and Savarajara, A. (2018). Diversity and characterization of cultivable oleaginous yeasts isolated from mangrove forests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 125.
- Lamers, D., van Biezen, N., Martens, D., Peters, L., van de Zilver, E., Jacobs-van Dreumel, N., Wijffels, R. H. and Lokman, C. (2016). Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC Biotechnology*, 16(1), 45.
- Leung, D. Y., Wu, X. and Leung, M. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4), 1083-1095.
- Li, M., Liu, G.-L., Chi, Z., Chi, Z.-M. J. B. and bioenergy. (2010). Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy*, 34(1), 101-107.
- Li, Q., Du, W. and Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(5), 749-756.
- Liang, K., Zhang, Q., Gu, M. and Cong, W. (2013). Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 311-318.
- Limsuwatthanathamrong, M., Sooksai, S., Chunhabundit, S., Noitung, S., Ngamrojanavanich, N. and 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.
- Lin, J., Li, S., Sun, M., Zhang, C., Yang, W., Zhang, Z., Li, X. and Li, S. (2014). Microbial lipid production by oleaginous yeast in d-xylose solution using a two-stage culture mode. *RSC Advances*, 4(66), 34944-34949.
- Lin, J., Shen, H., Tan, H., Zhao, X., Wu, S., Hu, C. and Zhao, Z. K. (2011). Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. *Journal of Biotechnology*, 152(4), 184-188.

- Liu, Y. Y., Chi, Z., Wang, Z. P., Liu, G. L. and Chi, Z. M. (2014). Heavy oils, principally long-chain n-alkanes secreted by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* strain P5 isolated from mangrove system. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(9), 1329-1337.
- Liu, Z., Zhao, Q., Lee, D. J. and Yang, N. (2008). Enhancing phosphorus recovery by a new internal recycle seeding MAP reactor. *Bioresource Technology*, 99(14), 6488-6493.
- Luque, L., Orr, V. C., Chen, S., Westerhof, R., Oudenhoven, S., van Rossum, G., Kersten, S., Berruti, F. and Rehm, L. (2016). Lipid accumulation from pinewood pyrolysates by *Rhodospiridium diobovatum* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 214, 660-669.
- Meesters, P., Huijberts, G. and 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(5), 575-579.
- Meo, A., Priebe, X. L. and Weuster-Botz, D. (2017). Lipid production with *Trichosporon oleaginosus* in a membrane bioreactor using microalgae hydrolysate. *Journal of Biotechnology*, 241, 1-10.
- Mostafa, M. and Amal, A. (1994). Effect of Phosphorus Starvation on Growth, Photosynthesis and Some Metabolic Processes in the Uni-cellular Green Alga *Chlorella kessleri*. *PHYTON*.
- Moustogianni, A., Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E. and Aggelis, G. (2015). Feasibility of raw glycerol conversion into single cell oil by zygomycetes under non-aseptic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(4), 827-831.
- Naganuma, T., Uzuka, Y. and Tanaka, K. (1985). Physiological factors affecting total cell number and lipid content of the yeast, *Lipomyces starkeyi*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 31(1), 29-37.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology*, 82(1), 43-49.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry

- of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1031-1051.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. (2002). Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(3), 308-312.
- Patel, A., Arora, N., Mehtani, J., Pruthi, V. and Pruthi, P. A. (2017). Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77, 604-616.
- Patel, A., Arora, N., Pruthi, V. and Pruthi, P. A. (2017). Biological treatment of pulp and paper industry effluent by oleaginous yeast integrated with production of biodiesel as sustainable transportation fuel. *Journal of Cleaner Production*, 142, 2858-2864.
- Patel, A., Pruthi, V. and Pruthi, P. A. (2017). Synchronized nutrient stress conditions trigger the diversion of CDP-DG pathway of phospholipids synthesis towards de novo TAG synthesis in oleaginous yeast escalating biodiesel production. *Energy*, 139, 962-974.
- Patel, A., Sindhu, D. K., Arora, N., Singh, R. P., Pruthi, V. and Pruthi, P. A. (2015). Biodiesel production from non-edible lignocellulosic biomass of *Cassia fistula* L. fruit pulp using oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresource Technology*, 197, 91-98.
- Polburee, P., Yongmanitchai, W., Honda, K., Ohashi, T., Yoshida, T., Fujiyama, K. and Limtong, S. (2016). Lipid production from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhodospiridium fluviale* DMKU-RK253 using temperature shift with high cell density. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 208-218.
- Poontawee, R., Yongmanitchai, W. and 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.
- Probst, K. V. and Vadlani, P. V. (2017). Single cell oil production by *Lipomyces starkeyi*: Biphase fed-batch fermentation strategy providing glucose for growth and xylose for oil production. *Biochemical Engineering Journal*, 121, 49-58.

- Qin, L., Liu, L., Zeng, A.-P. and Wei, D. (2017). From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*, 245, 1507-1519.
- Ratledge, C. and Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, 20(7), 155-160.
- Ratledge, C. and Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. In J. W. B. Allen I. Laskin, Geoffrey M. Gadd (Ed.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 51, pp. 1-52).
- Ratray, J., Schibeci, A. and Kidby, D. K. (1975). Lipids of yeasts. *Bacteriology Reviews*, 39(3), 197.
- Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D. and Clesceri, L. S. (2012). In *STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 22ND EDITION*: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T. and Bourtoom, T. (2011). Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(1), 23-33.
- Santos, C. A. and Reis, A. (2014). Microalgal symbiosis in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(13), 5839-5846.
- Sawangkeaw, R. and Ngamprasertsith, S. (2013). A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 25, 97-108.
- Sha, Q. (2013). *A comparative study on four oleaginous yeasts on their lipid accumulating capacity*. (Master's thesis), Sveriges lantbruksuniversitet Swedish University, Uppsala
- Sitepu, I. R., Garay, L. A., Sestric, R., Levin, D., Block, D. E., German, J. B. and Boundy-Mills, K. L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1336-1360.
- Soccol, C. R., Neto, C. J. D., Soccol, V. T., Sydney, E. B., da Costa, E. S. F., Medeiros, A. B. P. and de Souza Vandenberghe, L. P. (2017). Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodosporidium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane

- juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresource Technology*, 223, 259-268.
- Spencer, J., Spencer, D. and de Figueroa, L. (1997). Yeasts as living objects: yeast nutrition. In *Yeasts in natural and artificial habitats* (pp. 68-79): Springer.
- Taskin, M., Ortucu, S., Aydogan, M. N. and Arslan, N. P. (2016). Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. *Renewable Energy*, 99, 198-204.
- Tchakouteu, S. S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Kalantzi, O., Stoforos, N. G., Koutinas, A. A., Aggelis, G. and Papanikolaou, S. (2017). *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: Adaptation dynamics and lipid production. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 237-248.
- Thippawan Wattanagonniyom. (2015). *Increase of ethanol production from molasses by co-fermentation with cassava waste Hydrolysate*. (Master degree), Chulalongkorn University,
- Uprety, B. K., Dalli, S. S. and Rakshit, S. K. (2017). Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. *Energy Conversion and Management*, 135, 117-128.
- Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137-155.
- Wang, C., Li, Y., Xin, F., Liu, Y. and Chi, Z. (2014). Single cell oil production by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* P10 isolated from mangrove systems for biodiesel making. *Process Biochemistry*, 49, 725-731.
- Wang, Q., Guo F.J., Rong Y.J. and Chi Z.M. (2012). Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making. 46, 164-168.
- Wang, Y., Zhang, S., Zhu, Z., Shen, H., Lin, X., Jin, X., Jiao, X. and Zhao, Z. K. (2018). Systems analysis of phosphate-limitation-induced lipid accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1),

148.

- Wang, Z. P., Fu, W. J., Xu, H. M. and Chi, Z. M. (2014). Direct conversion of inulin into cell lipid by an inulinase-producing yeast *Rhodospiridium toruloides* 2F5. *Bioresource Technology*, 161, 131-136.
- Wang, Z. P., Xu, H. M., Wang, G. Y., Chi, Z. and Chi, Z. M. (2013). Disruption of the MIG1 gene enhances lipid biosynthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(4), 675-682.
- 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. and Zhao, Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 101(15), 6124-6129.
- Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q. and Zhao, Z. K. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology*, 102(2), 1803-1807.
- Xin, F. H., Zhang, Y., Xue, S. J., Chi, Z., Liu, G. L., Hu, Z. and Chi, Z. M. (2017). Heavy oils (mainly alkanes) over-production from inulin by *Aureobasidium melanogenum* 9-1 and its transformant 88 carrying an inulinase gene. *Renewable Energy*, 105, 561-568.
- Xu, J., Zhao, X., Wang, W., Du, W. and Liu, D. (2012). Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 30-36.
- Xu, X., Kim, J. Y., Cho, H. U., Park, H. R. and Park, J. M. (2015). Bioconversion of volatile fatty acids from macroalgae fermentation into microbial lipids by oleaginous yeast. *Chemical Engineering Journal*, 264, 735-743.
- Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H. and Tan, T. (2008). Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology*, 99(13), 5923-5927.
- Xue, F., Zhang, X., Luo, H. and Tan, T. (2006). A new method for preparing raw material

- for biodiesel production. *Process Biochemistry*, 41(7), 1699-1702.
- Xue, S. J., Chi, Z., Zhang, Y., Li, Y. F., Liu, G. L., Jiang, H., Hu, Z. and Chi, Z. M. (2018). Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(7), 1049-1060.
- Yong-Hong, L., Bo, L., Zong-Bao, Z. and Feng-Wu, B. (2006). Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(4), 650-656.
- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M. and Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*, 102(10), 6134-6140.
- Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B. and 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(5), 405-412.
- Zhu, F. (2015). Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 122, 456-480.
- Zhu, L., Zong, M. and Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99(16), 7881-7885.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว YM

ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลต์สกัด	3	กรัม
เบคโตเพปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
พีเอช		5.5±0.2

2. อาหารเหลวผลิตน้ำมัน (Lipid production medium)

ยีสต์สกัด	1	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.05	กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.01	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
พีเอช		5.5±0.2

ภาคผนวก ข.

สารเคมี

1. สีย้อมไนล์เรด เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ไนล์เรด	5	มิลลิกรัม
อะซีโตน	100	มิลลิลิตร



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว พุทธิตา โชคเหรียญสุขชัย
วัน เดือน ปี เกิด	9 พฤศจิกายน 2536
สถานที่เกิด	จังหวัดปทุมธานี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2549 - 2552 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนดอนเมืองทหารอากาศบำรุง พ.ศ. 2552 - 2555 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนคณะราษฎรบำรุง ปทุมธานี (แผนการเรียนคณิตศาสตร์-วิทยาศาสตร์) พ.ศ. 2555 - 2559 ระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2559 - 2562 ระดับปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย (สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์)
ที่อยู่ปัจจุบัน	171/301 ซ. เชิดวุฒากาศ 9/1 แขวงดอนเมือง เขตดอนเมือง กรุงเทพมหานคร 10210
ผลงานตีพิมพ์	Chokreansukchai, P. Oleaginous yeast isolated from mangrove forest in Chanthaburi province and its lipid production. In Proceeding of the 9th RMUTP International Conference, 93-97. 2018

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY