โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังโดยยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ชื่อนิสิต นายทรงเกียรติ์ สุขมงคลชัย รหัสประจำตัว 5932318123

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน	ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังโดยยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2
โดย	นายทรงเกียรติ์ สุขมงคลชัย รหัสนิสิต 5932318123
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

.... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

.... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร)

.... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ)

.... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของแป้ง

มันสำปะหลังโดยยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร

นิสิตในโครงการ

นายทรงเกียรติ์ สุขมงคลชัย

รหัสประจำตัว 5932318123

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

ชื่อโครงการ ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังโดยยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ชื่อนิสิตผู้นำเสนอโครงการ นายทรงเกียรติ์ สุขมงคลชัย

เลขประจำตัวนิสิต 5932318123

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

การเจริญและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์อุดมน้ำมัน *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในช่วงพีเอช 5.5-7.0 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่พีเอช 5.5 เท่ากับ 90 การผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG 8.2 จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง ที่พีเอช 5.5 เป็นเวลา 6 วัน ได้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด 3.11 กรัมต่อลิตร ยีสต์มีปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ 24.63 กรัมต่อกรัมเซล ล์แห้ง เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5.56 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เจริญในอาหาร YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คาดว่าระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG 8.2 เท่ากับ 6 วัน กรดไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG 8.2 ที่ผลิตได้ คือ กรดโอเลอิก ร้อยละ 35.17 กรดปาลมิโตเลอิก ร้อยละ 31.48 และกรดปาลมิติก ร้อยละ 22.03 จากผลการทดลองที่ได้ น้ำมันของยีสต์ *Cy. subsufficiens* NG 8.2 มีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งของกรดปาลมิโตเลอิกเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

คำสำคัญ: กรดปาลมิโตเลอิก ยีสต์อุดมน้ำมัน พีเอช ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต

Project title Effect of inoculum size on *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 oil production from cassava starch hydrolysate

Investigator Mr. Songkiat Sukmongkolchai

ID 5932318123

Project advisor Prof. Ancharida Savarajara, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

---

Abstract

Growth and survival percentage of oleaginous yeast, *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2, were not significantly different at pH range of 5.5-7.0. The survival percentage was 90 at pH 5.5. Production of *Cy. subsufficiens* NG 8.2 oil from cassava starch hydrolysate pH 5.5 yielded maximum oil yield (3.11 g/L) at 6 day when inoculum grown in YM for 48 h at 5.56 x 10^8 cell/mL was used. At this condition, the *Cy. subsufficiens* NG 8.2 had maximum oil content of 24.63% g/g dry weight cell. Optimal incubation time for the *Cy. subsuffciens* NG 8.2 oil production was expected to be at 6 day. Major fatty acid of the *Cy. subsufficiens* NG 8.2 oil were oleic acid (35.17%), palmitoleic acid (31.48%) and palmitic acid (22.03%). Based on these results, the *Cy. subsufficiens* NG 8.2 oil had a potential to be palmitoleic acid resource for further medical application.

Keyword: palmitoleic acid, oleaginous yeast, pH, survival percentage

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิตของภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาประจำโครงการ

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และความรู้ต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่มอบความรู้ และข้อคิดต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งส่งผลให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ และเข้าใจ รวมถึงการสนับสนุนในทางการศึกษาอย่างเต็มที่ ให้อิสระทางความคิดและเคารพในการตัดสินใจ

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือมาเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการ 1804/15 ของศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และสอนสิ่งต่าง ๆ รวมถึงการมอบความรู้และข้อคิดเห็นต่องานวิจัยเป็นอย่างดี ขอบคุณนางสาวภัทราทิพย์ คล่องแคล่ว เพื่อนร่วมห้องปฏิบัติการที่คอยให้ความช่วยเหลือ ร่วมกันแก้ปัญหา ให้คำปรึกษาและดูแลกันตลอดการทำโครงการนี้

ขอบคุณเพื่อน ๆ ภาคจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่น 43 และพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือ โดยเฉพาะ นางสาวพิลัมภา ตองอ่อน ห้องปฏิบัติการ 1904/14 และนางสาวณัฐมณ วาจรัส ห้องปฏิบัติการ 1904/15

ท้ายที่สุด ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบโอกาสอันทรงคุณค่าในการทำวิจัยนี้

ทรงเกียรติ์ สุขมงคลชัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
บทที่ 2 เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์	
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	8
เคมีภัณฑ์	9
เอนไซม์	10
เชื้อจุลินทรีย์	10
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
การหาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว YM	
การเตรียมอาหารเหลว YM	11
การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2	11
การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2	11

เรื่อง หน้า

การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง

การเตรียมอาหารเหลว YM 12

การเตรียมไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch hydrolysate) 12

การตรวจคุณภาพไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง 13

การเตรียมอาหารผลิตน้ำมัน (lipid production medium) 13

การเตรียมเซลล์ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 13

การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำมันของยีสต์เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันโดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน 13

การสกัดน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 14

การคำนวณหาปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมัน 14

การหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 14

การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 14

บทที่ 4 ผลการทดลอง

ผลการหาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว YM 15

ผลการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง 16

ผลการหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง (ผลที่คาดว่าจะได้รับสำหรับการทดลองที่จะศึกษาต่อไป) 17

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 17

เรื่อง	หน้า
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	19
เอกสารอ้างอิง	21
ภานผนวก	24
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ	25
ภาคผนวก ข. องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง	26

สารบัญรูปภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 ความชุกของปัจจัยเสี่ยงโรคหัวและหลอดเลือดของประชากรไทยอายุ 15 ปีขึ้นไป NHES 3-5	2
ภาพที่ 2 การตีบตันของหลอดเลือดเมื่อมีภาวะไขมันในเส้นเลือดสูง	3
ภาพที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของกรดปาลมิโตเลอิก	4
ภาพที่ 4 การสังเคราะห์กรดไขมัน	4
ภาพที่ 5 แผนภาพการผลิตไขมันในยีสต์อุดมน้ำมัน	6
ภาพที่ 6 ช่องของ haemacytometer ที่ใช้นับเซลล์	12

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์และร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีค่าพีเอช 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 15

ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์และร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีค่าพีเอช 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 16

ตารางที่ 3 การเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน 17

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 18

ตารางที่ ข1 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง 25

บทที่ 1

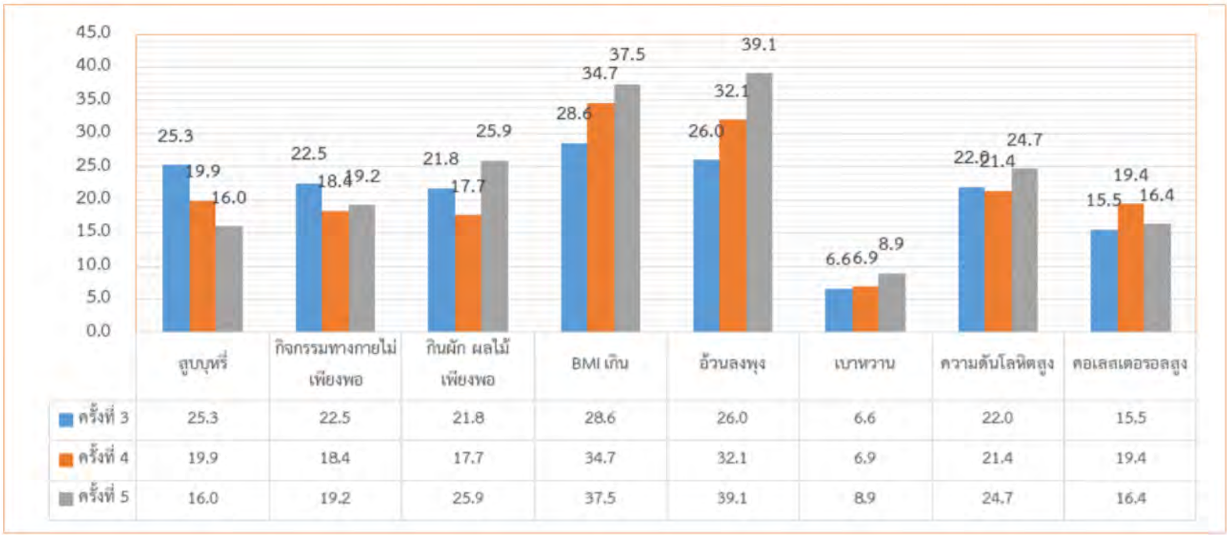
บทนำ

ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ปัญหา "โรคหัวใจ" เป็นภัยเงียบที่คุกคามสุขภาพความเป็นอยู่ของคนในยุคปัจจุบัน โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่าในปี 2558 กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ของโลก โดยคิดเป็นร้อยละ 31 ของการเสียชีวิตของคนทั้งโลก ในประเทศไทยจากรายงานสถิติสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2555-2559 พบอัตราการตายและป่วยด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจยังคงมีความรุนแรงและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง และจากรายงานการเสียชีวิตขององค์การอนามัยโลกในปี พ.ศ. 2559 พบทั่วโลกมีผู้เสียชีวิตปีละประมาณ 56.9 ล้านคน โรคหัวใจขาดเลือดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ประมาณการมีผู้เสียชีวิต 9.2 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 16.2 สำหรับประเทศไทย จากรายงานกองยุทธศาสตร์และแผนงาน กระทรวงสาธารณสุข พบแนวโน้มอัตราการเสียชีวิตจากโรคหัวใจขาดเลือดต่อประชากร 100,000 คน ปี พ.ศ. 2555 - 2559 เท่ากับ 26.9, 27.8, 29.9, 32.3 และ 31.8 และสอดคล้องกับอัตราป่วยด้วยโรคหัวใจขาดเลือดต่อประชากร 100,000 คน 431.91, 407.70, 501.13, 210.21 และ 501.41 ตามลำดับ ในระหว่าง พ.ศ. 2556 – 2560 จากข้อมูลทั้งการเสียชีวิตและการป่วยด้วยโรคหัวใจขาดเลือดที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และยังคงทวีความรุนแรง เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การสูญเสียปีสุขภาวะจากการตายก่อนวัยอันควรและความบกพร่องทางสุขภาพ (Disability-Adjusted Life Years : DALYs) พ.ศ. 2557 พบว่าโรคหัวใจขาดเลือดเป็นสาเหตุของการสูญเสียปีสุขภาวะลำดับที่ 4 ในเพศชาย และลำดับที่ 3 ในเพศหญิง ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากร เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการเสียชีวิตก่อนวัยอันควร ทั้งในระดับบุคคล ครอบครัว สังคม และ ประเทศชาติ ซึ่งสถิติล่าสุดของกระทรวงสาธารณสุข เมื่อเดือนกันยายน 2561 พบว่ามีผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด 432,943 คน อัตราเสียชีวิต 20,855 คน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ มาจากการใช้ชีวิตประจำวัน อาหารการกิน และการขาดการออกกำลังกาย

โรคหลอดเลือดหัวใจตีบเกิดจากหลอดเลือดแดงที่เลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจตีบหรือตัน ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากไขมันและเนื้อเยื่อสะสมอยู่ในผนังของหลอดเลือด (หรือที่เรียกว่า Plaque) มีผลให้เยื่อบุผนังหลอดเลือดชั้นในตำแหน่งนั้นหนาตัวขึ้น พยาธิสภาพดังกล่าวทำให้หลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจมีการแคบลงทำให้เลือดที่ขนส่งออกซิเจน และสารอาหารไปสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ถูกขนส่งผ่านไปได้น้อยลงหรืออาจผ่านไม่ได้เลย ทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการและมีอาการแสดงของภาวะหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ซึ่งจะทำให้มีอาการเจ็บหน้าอกเกิดขึ้น หากเกิดการอุดตันเฉียบพลันซึ่งมักเกิดจากคราบไขมันที่สะสมอยู่ที่ผนังของหลอดเลือดชั้นในแตกออกและกลายเป็นลิ่มเลือดจะส่งผลให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน อันนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ หรือเสียชีวิตกะทันหันได้

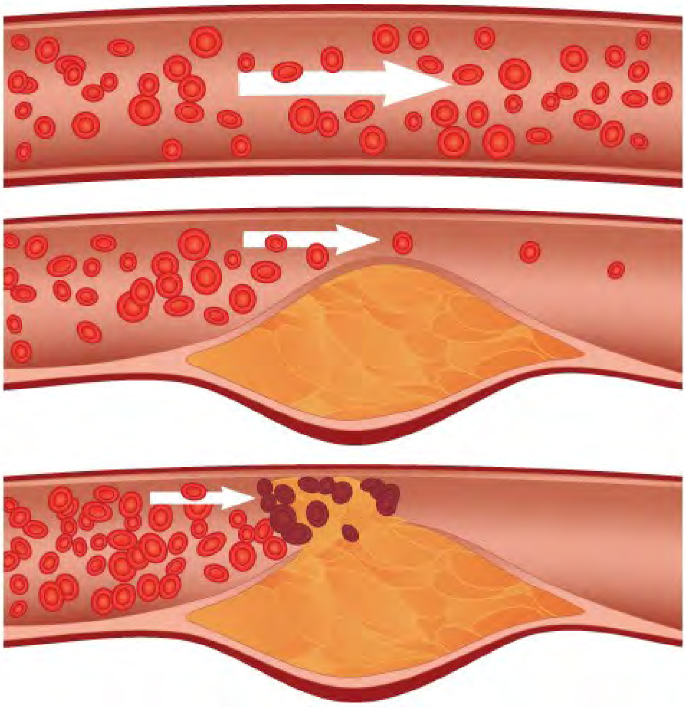
ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ปัจจัยเสี่ยงที่ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้ ได้แก่ ประวัติครอบครัว หากมีบุคคลในครอบครัวเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ ก็มีโอกาสเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจเพิ่มขึ้น อายุ เมื่ออายุมากขึ้นเกิดการเสื่อมสภาพของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น เพศ เพศชายมีโอกาสเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้มากกว่าเพศหญิง แต่ในเพศหญิงที่หมดประจำเดือนแล้วมีโอกาสเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจใกล้เคียงกับเพศชาย และปัจจัยเสี่ยงที่สามารถปรับเปลี่ยนได้ ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมีสาเหตุจากพฤติกรรมสุขภาพที่ไม่ถูกต้องโดยอาจมีปัจจัยเสี่ยงเดียวหรือหลายปัจจัยเสี่ยงรวมกันก็ได้ ดังนี้ การมีภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ ภาวะอ้วนลงพุง การสูบบุหรี่ การไม่ออกกำลังกาย การไม่กินผักและผลไม้ ความเครียด การเป็นโรคเบาหวาน และภาวะความดันโลหิตสูง เกณฑ์การวินิจฉัย คือ มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ 140/90 มิลลิเมตรปรอท โดยภาวะความดันโลหิตสูงจะทำให้กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้ายหนาตัวขึ้นซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด จากข้อมูลการศึกษา Thai Registry in Acute Coronary Syndrome (TRACS) ปัจจัยเสี่ยงของคนไทยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจ คือ ภาวะไขมันในเลือดสูง ร้อยละ 83.2 ภาวะความดันโลหิตสูง ร้อยละ 59.5 โรคเบาหวาน ร้อยละ 50.7 การสูบบุหรี่ ร้อยละ 32.1 และครอบครัวมีประวัติโรคหลอดเลือดหัวใจ ร้อยละ 9.3 จะเห็นได้ว่า สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการมีพฤติกรรมสุขภาพที่ไม่เหมาะสม ซึ่งจากข้อมูลผลการสำรวจสุขภาพของประชากรไทย 15 ปีขึ้นไป โดยการตรวจร่างกาย ครั้งที่ 3-5 (NHES 3-5) พบความชุกของปัจจัยเสี่ยงสำคัญของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด คือ ภาวะอ้วน น้ำหนักเกิน โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง และภาวะคอเรสเตอรอลในเลือดสูง มีแนวโน้มสูงขึ้น (กองโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค, 2562)



ภาพที่ 1 ความชุกของปัจจัยเสี่ยงโรคหัวและหลอดเลือดของประชากรไทยอายุ 15 ปีขึ้นไป NHES 3-5

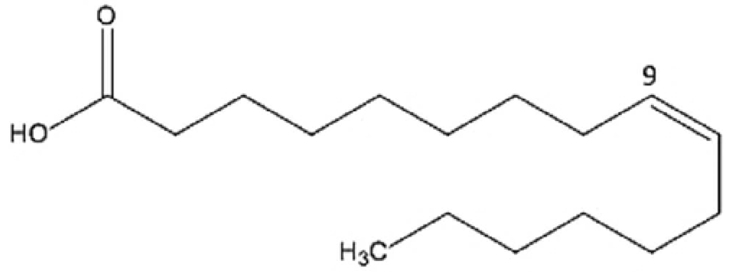
ภาวะไขมันในเส้นเลือดสูง คือ ภาวะที่ร่างกายมีระดับไขมันในหลอดเลือดสูงกว่าปกติทำให้หลอดเลือดเสื่อมสภาพ เมื่อไขมันเกาะสะสมหนาที่ผนังหลอดเลือดเป็นเวลานาน ทำให้หลอดเลือดสูญเสียความยืดหยุ่น เป็น

ต้นเหตุของการตีบตัน โดยระดับไขมันในเลือดอาจเป็นระดับคอเลสเตอรอลสูง หรือระดับไตรกลีเซอไรด์สูงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือสูงทั้งสองชนิดก็ได้ ซึ่งค่าปกติของคอเลสเตอรอลรวมไม่ควรเกิน 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร คอเลสเตอรอล แบ่งย่อยเป็น 2 ชนิด คือ คอเลสเตอรอลชนิดเลว (LDL) ถ้ามีในระดับสูงเกินไปจะไปสะสมที่ด้านในของผนังหลอดเลือดแดง ค่าระดับปกติของแอลดีแอลไม่ควรเกิน 130 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร คอเลสเตอรอลชนิดดี (HDL) เป็นชนิดที่มีประโยชน์ ทำหน้าที่นำคอเลสเตอรอลส่วนเกินจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ และจากผนังหลอดเลือดไปทำลายที่ตับ เอชดีแอล สูงได้จากการออกกำลังกาย ผู้ที่มีคอเลสเตอรอลชนิดนี้สูงจะช่วยป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว ค่าระดับปกติในเลือดของผู้ชายมากกว่า 40 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ค่าระดับปกติในผู้หญิงมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ไตรกลีเซอไรด์ เป็นไขมันที่เก็บสะสมไว้เป็นพลังงานสำรอง ไขมันชนิดนี้ควรมีในเลือดไม่เกิน 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยมีค่าระดับปกติในเลือดระหว่าง 50-150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร



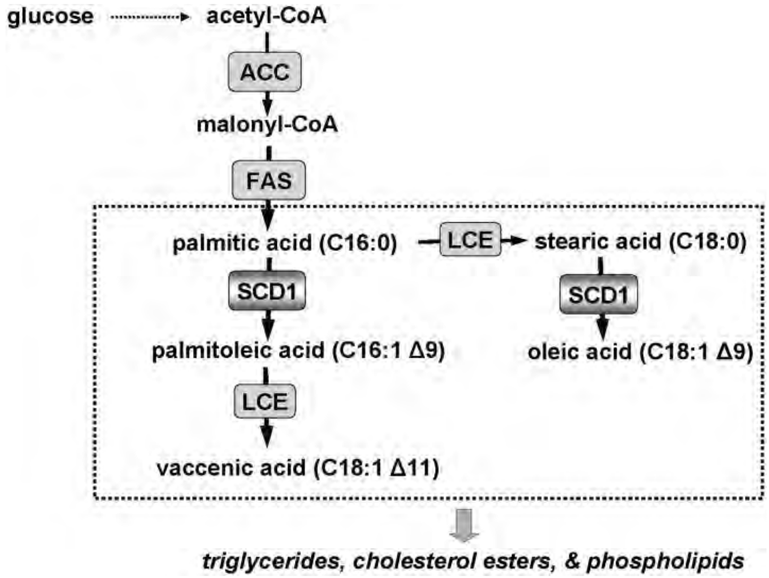
ภาพที่ 2 การตีบตันของหลอดเลือดเมื่อมีภาวะไขมันในเส้นเลือดสูง (ศูนย์โรคหลอดเลือดสมองพญาไท, 2559)

ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะค้นหาแนวทางการรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งหนึ่งในแนวทางการรักษา คือ การใช้กรดปาลมิโตเลอิก โดยมีงานวิจัย (Passos และคณะ, 2016) กล่าวว่า กรดปาลมิโตเลอิกนี้มีส่วนช่วยในการลดไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดไขมันอุดตันในเส้นเลือดและนำมาสู่โรคหัวใจและหลอดเลือด



ภาพที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของกรดปาลมิโตเลอิก (Rox และคณะ, 2017)

กรดปาลมิโตเลอิก (palmitoleic acid) หรือโอเมก้า 7 (mega-7 monosaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว สายโซ่ยาวปานกลาง มีคาร์บอน 16 ตำแหน่งและมีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง (C16:1) มีสูตรทางเคมีคือ $CH_3(CH_2)_5CH = CH(CH_2)_7COOH$ กรดปาลมิโตเลอิกพบได้ในทุกเนื้อเยื่อ แต่ถูกสังเคราะห์และหลั่งจากเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) การสังเคราะห์กรดปาลมิโตเลอิกเกิดจากการเติมพันธะคู่ (desaturation reaction) ที่กรดปาลมิติก โดยการทำงานของเอนไซม์ stearoyl-CoA desaturase (SCD)1



ภาพที่ 4 การสังเคราะห์กรดไขมัน (Landry และคณะ, 2011)

นอกจากร่างกายจะสามารถสังเคราะห์กรดปาลมิโตเลอิกได้เองแล้วยังสามารถพบกรดไขมันชนิดนี้ได้ในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วแมคคาเดเมีย แต่การนำผลผลิตทางการเกษตรมาใช้ในการรักษา อาจส่งผลให้ปริมาณการผลิตไม่เพียงพอที่จะตอบสนองความต้องการทั้งด้านอาหารและการรักษา รวมถึงการควบคุมคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรยังทำได้ยาก เนื่องจากคุณภาพของผลผลิตมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพภูมิอากาศ และฤดูกาลที่แตกต่างกันไป ด้วยเหตุผลเหล่านี้จึงต้องศึกษาเพื่อหาแหล่งของกรดไขมันที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการรักษา ซึ่งพบว่าในแหล่งน้ำมันจากจุลินทรีย์หรือ single cell oil (SCO) มีกรดปาลมิโตเลอิกเป็นองค์ประกอบ การผลิต

น้ำมันจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี ไม่ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศหรือฤดูกาล และใช้พื้นที่ในการผลิตน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกพืชผลทางการเกษตรที่ต้องการพื้นที่ในการเพาะปลูกจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวและขนส่ง ส่งผลให้ต้นทุนของวัตถุดิบมีราคาสูงซึ่งนำไปสู่ราคาของกรดปาลมิโตเลอิกที่สูงขึ้น

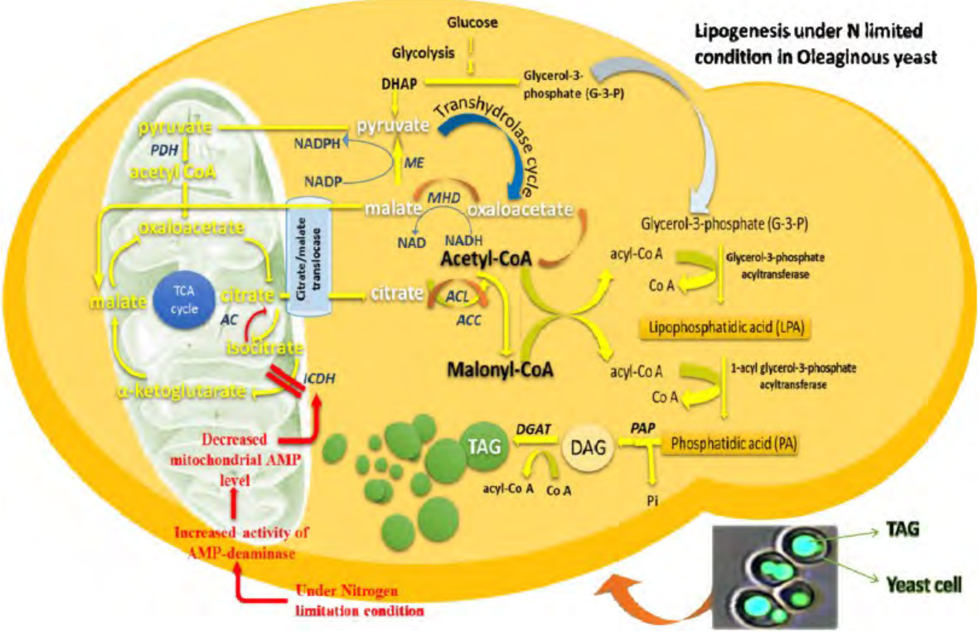
จุลินทรีย์อุดมน้ำมัน (oleaginous microorganisms) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์มากถึงร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Galafassi และคณะ, 2012) แม้ว่าจุลินทรีย์อุดมน้ำมันประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายประเภท แต่ด้วยข้อจำกัดของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย มีการสะสมน้ำมันที่บริเวณ outer membrane การสกัดน้ำมันออกมาทำได้ยาก สาหร่ายเซลล์เดียวต้องใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์เพื่อเป็นพลังงานในการสังเคราะห์น้ำมัน ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนไม่สามารถใช้วัตถุดิบอื่นทดแทน รา อัตราการผลิตน้ำมันช้าและน้ำมันที่ได้ด้อยคุณภาพ ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้จึงเป็นเหตุให้ยีสต์อุมดมน้ำมัน (oleaginous yeast) เป็นจุลินทรีย์ผลิตน้ำมันที่น่าสนใจและมีศักยภาพที่สุด (Ageitos และคณะ, 2011) น้ำมันยีสต์มีโครงสร้างของกรดไขมันเป็นแบบ polyunsaturated fatty acid triacylglycerol หรือ TAG ที่มีองค์ประกอบคล้ายกับน้ำมันพืช ยีสต์สามารถใช้แหล่งอาหารได้หลากหลาย เช่น น้ำตาลจากเศษซากวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร (lignocellulose) กลีเซอรอล (glycerol) ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล น้ำเสีย (waste water) ไฮโดรไลเสตของแป้ง (starch hydrolysate) โดยอ้างอิงจาก Qin และคณะ (2017) นอกจากนี้ยีสต์ยังมีวงจรชีวิตสั้น มีอัตราการเจริญเร็ว ความหนาแน่นของเซลล์สูง ไม่ต้องการแสงในการเจริญ ไม่ไวต่อสภาพภูมิอากาศ

ยีสต์อุดมน้ำมันสามารถผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่ยีสต์โดยทั่วไปสามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้เพียงร้อยละ 6-8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยไขมันที่ผลิตเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Schulze และคณะ, 2014) ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน (Chang และคณะ, 2015) ยีสต์จะเปลี่ยนจากการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวน เป็นการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ในรูปของหยดน้ำมัน (oil droplet) องค์ประกอบของกรดไขมันมีความแตกต่างกันไปตามสปีชีส์ของยีสต์ โดยทั่วไปมีกรดไขมัน เช่น กรดไมริสติก (C14:0) กรดปาลมิติก (C16:0) กรดปาลมิโตเลอิก (C16:1) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดไลโนเลอิก (C18:2) เป็นองค์ประกอบ (Patel และคณะ, 2016)

Pranimit (2017) แยกยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ซึ่งเป็นยีสต์อุดมน้ำมันได้จากดินในประเทศไทย และพบว่าน้ำมันของยีสต์ชนิดนี้มีกรดปาลมิโตเลอิก เป็นองค์ประกอบสูงถึงร้อยละ 16 ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนสูง และไนโตรเจนต่ำ (กลูโคส ร้อยละ 5 สารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 0.1 แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0.1 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ร้อยละ 0.005 โซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.001 แคลเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.001 (น้ำหนักต่อปริมาตร)), ค่าพีเอช 5.5 (ดัดแปลงจาก Tanimura และคณะ,

2014) บ่มแบบเขย่าให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน นอกจากนี้ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ยังมีอัตราการเจริญเร็ว และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย

ยีสต์อุดมน้ำมันในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนสูงแต่แหล่งไนโตรเจนต่ำ สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในช่วงระยะแรก เมื่อแหล่งไนโตรเจนในอาหารหมด adenosine monophosphate deaminase จะถูกกระตุ้นและไปเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน AMP ในไมโตคอนเดรียเป็น inosine 5’-monophosphate และแอมโมเนียม ซึ่งการทำงานนี้ของเอนไซม์ adenosine monophosphate deaminase พบเฉพาะในยีสต์อุดมน้ำมันเท่านั้น การลดระดับลงของ AMP ทำให้ isocitrate dehydrogenase ไม่ทำงาน และ isocitrate ไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็น α-ketoglutarate ผ่านวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid หรือ TCA cycle) ทำให้มีการสะสมของ isocitrate และ isocitrate จะถูกเปลี่ยนไปเป็น citrate ทำให้มีปริมาณของ citrate สูงในไมโตคอนเดรีย citrate จึงถูกส่งออกไปยังไซโตซอล (cytosol) ผ่านช่องทาง citrate/malate antiport และถูกเปลี่ยนเป็น oxaloacetate จากขั้นตอนนี้ทำให้ยีสต์ได้ acetyl Co-A ซึ่งยีสต์จะนำไปเปลี่ยนเป็นหยดน้ำมันในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล โดยจะเปลี่ยน phosphatidic acid (PA) ที่เกิดขึ้นจาก glycerol-3-phosphate (G-3-P) หรือ dihydroxyacetone phosphate (DHAP) ขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่มีในอาหาร ด้วยเอนไซม์ phosphatidate phosphatase (PAP) เป็น diacylglycerol (DAG) ผ่านปฏิกิริยาการปล่อยหมู่ฟอสเฟตออก (dephosphorylation reaction) และในขั้นตอนสุดท้าย acetyl Co-A จะจับกับสายโซ่หลักของ DAG ด้วยการทำ diacylglycerol acyltransferases ได้เป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลในที่สุด การสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลสามารถเรียกว่า Kennedy pathway (Patel และคณะ, 2016)



ภาพที่ 5 แผนภาพการผลิตไขมันในยีสต์อุดมน้ำมัน (Patel และคณะ, 2016)

ปัจจัยที่กระตุ้นให้ยีสต์ผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ นอกจากสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนสูงแต่มีแหล่งไนโตรเจนต่ำ หรือสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนสูงแต่มีแหล่งฟอสเฟตต่ำ ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ทำให้ยีสต์ผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ปริมาณมาก คือ อายุของยีสต์ ค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิที่เจริญ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตและสะสมน้ำมัน (Patel และคณะ, 2016)

การผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์เกิดขึ้นในสภาวะที่มีคาร์บอนปริมาณมากและขาดแคลนไนโตรเจน ดังนั้นอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจึงเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำ เช่น อาหารที่อ้างอิงจากงานวิจัยของ Galafassi และคณะ (2012) ซึ่งเป็นอาหารสังเคราะห์ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในระดับอุตสาหกรรมเป็นการเพิ่มต้นทุน เนื่องจากกลูโคสมีราคาสูง จึงมีงานวิจัยมากมายสนใจในการนำวัสดุทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในระดับอุตสาหกรรมแทนการใช้กลูโคส

มันสำปะหลัง (cassava) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยมีผลผลิตปริมาณมากในแต่ละปี โดยประเทศไทยถือเป็นผู้ผลิตอันดับ 2 ของโลก มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 9 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 30 ล้านตันต่อปี คิดเป็นร้อยละ 9 ของผลผลิตมันสำปะหลังจากทั่วโลก นอกจากนี้มันสำปะหลังยังเป็นพืชที่ปลูกง่าย ใช้น้ำน้อย และใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน เป็นพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) โดยมันสำปะหลังมีองค์ประกอบหลัก คือ แป้งประมาณร้อยละ 80 ของน้ำหนักแห้ง มีปริมาณโปรตีนน้อย เนื่องจากยีสต์อุดมน้ำมันจะผลิตและสะสมน้ำมันเมื่อเจริญในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและมีแหล่งไนโตรเจนน้อย ดังนั้นแป้งมันสำปะหลังจึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมันเพื่อการผลิตน้ำมัน

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว YM

2. เพื่อศึกษาหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง

3. เพื่อศึกษาหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง

บทที่ 2

เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องมือกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, USA
2. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated incubator shaker) รุ่น innova® 4300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
3. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG6002-S บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-352 และ ES-315 บริษัท Torny Seiko, Japan และรุ่น HV-25 บริษัท HiRaYaMa, Japan
6. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) รุ่น 5922 บริษัท Kubota, Japan
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้สำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก (high speed refrigerated microtube centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
10. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) รุ่น EYELA FD-1 บริษัท Tokyo Rikakikai, Japan
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S-20K บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S-UV-VIS บริษัท Thermo Scientific Inc, USA

13. เครื่องวิเคราะห์สารชีวเคมี (biochemistry analyzer) รุ่น 7100 MBS บริษัท YSI, USA

14. ตู้ดูดไอสารระเหยสารเคมี (fume hood) บริษัท Flexlab, Thailand

15. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) บริษัท Lab service, Thailand

16. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand

17. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Thailand

18. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 5000 ไมโครลิตร บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

19. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น SS40-D บริษัท Grant Instrument, UK

20. อ่างส่งคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น Elma E30H บริษัท Tovatech, USA

เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: HCl) บริษัท Sigma Inc, Germany

2. กลูโคส (D-glucose: $C_6H_{12}O_6$) บริษัท Sigma Inc, Germany

3. คลอโรฟอร์ม (chloroform: $CHCl_3$) บริษัท V.S. Chem house, Bangkok

4. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

5. โซเดียมไฮดรอดไซด์ (sodium hydroxide: NaOH) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

6. เพปโทน (peptone) บริษัท Becton Co. Ltd, Germany

7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate: KH_2PO_4) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

8. เมทานอล (methanol: CH_3OH) บริษัท V.S. Chem house, Bangkok

9. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate: $MgSO_4{\bullet}7H_2O$)

บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

10. วุ้นผง (agar) บริษัท Becton, USA

11. สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท Becton, Dickinson & Company, USA

12. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Becton Co. Ltd, Germany

13. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate: $(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

เอนไซม์

1. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) 120,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บริษัท Siam Victory Chemicals Co. Ltd, Thailand

2. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) 220,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บริษัท Siam Victory Chemicals Co. Ltd, Thailand

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ คือ subcultured และ lyophilized (MSCU 1058) คัดแยกได้จากดิน จังหวัดระนอง (Pranimit, 2017)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การหาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว YM

3.1.1 การเตรียมอาหารเหลว YM

อาหารเหลว YM เตรียมโดยละลายกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 3 กรัมต่อลิตร เพปโทน (peptone) 5 กรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่น ปรับค่าพีเอชเป็น 5.5, 6.5, 7.0 และ 7.5 หลังจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

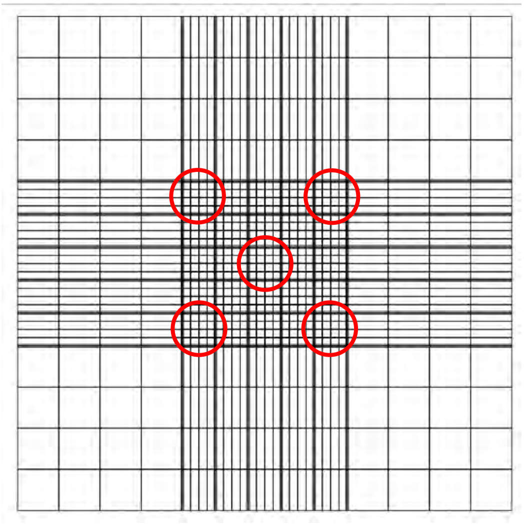
3.1.2 การเพาะเลี้ยงยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2

ถ่ายโอนโคโลนีเดี่ยวยีสต์จากทั้ง 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ (subcultured และ lyophilized (MSCU 1058)) ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM (กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากมอลต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร เพปโทน 5 กรัมต่อลิตร และวุ้นผง (agar) 20 กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในอาร์มฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เป็น 0.8 เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ปิเปตต์ยีสต์จากในอาร์มฟลาสก์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปนับจำนวนเซลล์ หลังจากนั้นถ่ายโอนยีสต์เริ่มต้นจากอาร์มฟลาสก์เดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว YM 45 มิลลิลิตร ที่บรรจุในอาร์มฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ปิเปตต์ยีสต์จากในอาร์ม ฟลาสก์ปริมาตร 1 มิลลิตร นำไปนับจำนวนเซลล์

3.1.3 การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2

ปิเปตต์ยีสต์จากอาร์มฟลาสก์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาดเล็กที่บรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำเจือจางเพิ่มอีก 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เมื่อได้ที่ความเจือจาง 100 เท่า หยดเมทิลีนบลู (methylene blue) 2 หยด ปิเปตต์ 10 ไมโครลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตต์ ขนาด 10 ไมโครลิตร ลงในช่องสำหรับนับเซลล์ของ haemacytometer ที่มีความลึก 0.1 มิลลิเมตร และถูกปิดด้วย cover glass ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า นับเซลล์ยีสต์ในช่องเล็กตรงกลางที่มีจำนวน 25 ช่อง โดย

เลือกนับ 5 ช่อง คือ ช่องบนซ้าย ช่องบนขวา ช่องกลาง ช่องล่างซ้าย และช่องล่างขวา (ภาพที่ 6) ไม่นับเซลล์ยีสต์ที่อยู่บนเส้นด้านซ้ายและด้านบนของช่อง ถ้าเซลล์เป็นสีฟ้า นับเป็นเซลล์ตาย และถ้าเซลล์ใส ไม่มีสี นับเป็นเซลล์ที่มีชีวิต



ภาพที่ 6 ช่องของ haemacytometer ที่ใช้นับเซลล์ (วงกลมสีแดง)

3.2 การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง

3.2.1 การเตรียมอาหารเหลว YM

อาหารเหลว YM เตรียมตามวิธีข้อ 3.1.1 แต่ปรับค่าพีเอชเป็น 5.5 (ผลจากข้อ 3.1) หลังจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.2 การเตรียมไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch hydrolysate)

ไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง เตรียมโดยการใส่แป้งมันสำปะหลัง 20 กรัม ในขวด duran ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเป็น 5.8 จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ปริมาตร 270 ไมโครลิตร บ่มแบบเขย่าในอ่างน้ำที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง ปรับค่าพีเอชเป็น 4.5 จากนั้นเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาตร 90 ไมโครลิตร บ่มแบบเขย่าในอ่างน้ำที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บ

ส่วนน้ำใสมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำมาเตรียมเป็นอาหารผลิตน้ำมัน (Palasak และคณะ, 2019)

3.2.3 การตรวจคุณภาพไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง

ตรวจสอบคุณภาพของไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลังจากข้อ 3.2.2 โดยการวัดปริมาณกลูโคสด้วยเครื่องวิเคราะห์สารชีวเคมี ความเข้มข้นของกลูโคสที่ควรได้จากไฮโดรไลเสตต้องไม่น้อยกว่า 100 กรัมต่อลิตร

3.2.4 การเตรียมอาหารผลิตน้ำมัน (lipid production medium)

อาหารผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง เตรียมโดยนำไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลังจากข้อ 3.2.2 ปรับค่าพีเอชเป็น 5.5 (ผลจากข้อ 3.1) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.2.5 การเตรียมเซลล์ยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2

ถ่ายโอนโคโลนีเดี่ยวยีสต์จากคลังเชื้อจุลินทรีย์ (ผลจากข้อ 3.1) ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในอาร์มฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เป็น 0.8 เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายโอนยีสต์เริ่มต้นจากอาร์มฟลาสก์เดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว YM 45 มิลลิลิตร ที่บรรจุในอาร์มฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

3.2.6 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำมันของยีสต์เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมัน โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน

ล้างเซลล์ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากข้อ 3.2.5 โดยแขวนลอยในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง แขวนลอยเซลล์ที่ได้ในอาหารผลิตน้ำมันปริมาตร 10 มิลลิลิตร และถ่ายโอนเซลล์แขวนลอยที่ได้ลงในอาหารผลิตน้ำมันปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ถ่ายโอนลงในอาหารผลิตน้ำมันเป็น 1.0×10^8, 5.56×10^8 และ 2.75×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ผลจากข้อ 3.1.3) บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 6 วัน ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างเซลล์ยีสต์โดยการปั่นเหวี่ยงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และแขวนลอยเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้เยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ (lyophilization) จากนั้นนำไปสกัดน้ำมัน

3.2.7 การสกัดน้ำมันยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2

บดเซลล์แห้งที่ได้หลังจากการทำให้เยือกแข็งภายใต้สุญญากาศที่บรรจุในถุงซิปใสเพื่อให้เซลล์ไม่จับตัวเป็นก้อน ชั่งเซลล์แห้ง 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว เพื่อสกัดน้ำมันตามิวิธีของ Kitcha และคณะ (2011) เติมคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ($CHCl_3$: CH_3OH, 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปั่นผสม 15 วินาที ทำให้เซลล์แตกโดยการใช้คลื่นความถี่สูง (37 กิโลเฮิร์ต) นาน 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที เก็บส่วนใสด้านบนมาเติมโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 0.73 โดยมวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ใช่ไขมันออกไป (Axelsson และ Gentil, 2014) ปั่นผสมให้เข้ากัน 15 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนใสชั้นล่างใส่หลอดทอลองที่ทราบน้ำหนัก นำไปประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้องจนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักน้ำมันที่ได้

3.2.8 การคำนวณหาปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมัน

$$\text{ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ (ร้อยละ กรัมต่อกรัม) :}\ \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์ที่ใช้สกัดน้ำมัน}} \times 100$$

$$\text{ผลผลิตน้ำมัน (กรัมต่อลิตร) :}\ \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์ที่ใช้สกัดน้ำมัน}} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)}$$

3.3 การหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.56×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แปรผันระยะเวลาการบ่มในอาหารผลิตน้ำมันเป็น 2, 4, 6 และ 8 วัน

3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

นำเซลล์ยีสต์ที่ได้หลังการเลี้ยงในอาหารผลิตน้ำมันใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.56×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 6 วัน มาล้างโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันด้วยวิธี Gas-Chromatography (GC) ที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการหาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว YM

เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากทั้ง 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว YM บ่มแบบเขย่าให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายโอนเซลล์ยีสต์ร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในอาหารเหลว YM อีกครั้ง บ่มที่สภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์จากทั้ง 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์หลังบ่มครบ 24 ชั่วโมง มีร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 100 ยีสต์จากคลัง lyophilized (MSCU 1058) มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด 6.13×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มากกว่ายีสต์จากคลัง subcultured (ตารางที่ 1) หลังบ่มครบ 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์จากคลัง subcultured เจริญได้ดีที่สุดเมื่ออาหารเหลว YM มีค่าพีเอชเป็น 6.5 นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อปริมาตรได้เท่ากับ 5.66×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเจริญได้น้อยที่สุดเมื่อค่าพีเอชเป็น 7.0 แต่มีร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด คือ ร้อยละ 92.17 ยีสต์จากคลัง lyophilized เจริญได้ดีที่สุดเมื่ออาหารเหลว YM มีค่าพีเอชเป็น 7.0 มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อปริมาตรเท่ากับ 6.49×10^{8} และเจริญได้น้อยที่สุดเมื่อค่าพีเอชเป็น 5.5 โดยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตมากที่สุด คือ อาหารที่มีค่าพีเอชเป็น 6.5 ซึ่งมีค่าร้อยละ 95.18 (ตารางที่ 2) เลือกใช้ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficien* NG 8.2 จากคลัง lyophilized MSCU1058 เนื่องจากมีจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่สูงกว่า และเลือกใช้ค่าพีเอชที่ 5.5 เพราะยีสต์อุดมน้ำมันส่วนใหญ่ผลิตน้ำมันได้มากเมื่อค่าพีเอชเป็นกรด ในการทดลองถัดไป

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์และร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีค่าพีเอช 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

คลังเชื้อจุลินทรีย์	ค่าพีเอช	จำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อมิลลิลิตร	ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต
Subcultured	5.5	5.79×10^{8}	100
Lyophilized	5.5	6.13×10^{8}	100

ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์และร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่มีค่าพีเอช 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

คลังเชื้อจุลินทรีย์	ค่าพีเอช	จำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อมิลลิลิตร	ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต
Subcultured	5.5	5.09×10^8	90.18
	6.0	5.24×10^8	91.31
	6.5	5.66×10^8	91.85
	7.0	5.00×10^8	92.17
Lyophilized	5.5	5.56×10^8	94.01
	6.0	6.32×10^8	95.16
	6.5	6.11×10^8	95.18
	7.0	6.49×10^8	95.12

4.2 ผลการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง

เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลังที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน คือ 1.0×10^8, 5.56×10^8 และ 2.75×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน ทำให้เซลล์เยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ และนำไปสกัดน้ำมัน พบว่าได้ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์สูงที่สุดร้อยละ 24.63 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุด 3.11 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5.56×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ต่ำที่สุดร้อยละ 4.39 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีผลผลิตน้ำมัน 0.98 กรัมต่อลิตร

แต่มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด 22.33 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 2.75×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0×10^8 มีผลผลิตน้ำมันต่ำที่สุดคือ 0.66 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์ทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ (ร้อยละ (กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง))	ผลผลิตน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)
1.0×10^8	3.86	17.33	0.66
5.56×10^8	12.64	24.63	3.11
2.75×10^9	22.33	4.39	0.98

4.3 ผลการหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง (ผลที่คาดว่าจะได้รับสำหรับการทดลองที่จะศึกษาต่อไป)

เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.56×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 วัน คาดว่าผลการทดลองที่จะได้รับ คือ ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมันสูงที่สุดเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมันที่ต่ำที่สุดเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 8 วัน

4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.56×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าประกอบด้วย กรดไมริสติก (C14:0) ร้อยละ 1.19 กรดปาลมิติก (C16:0) ร้อยละ 22.03 กรดปาลมิโตเลอิก (C16:1) ร้อยละ 31.48 กรดสเตียริก (C18:0) ร้อยละ 0.27 กรดโอเลอิก (C18:1) ร้อยละ 35.71 และกรดไลโนเลอิก (C18:2) ร้อยละ 8.62 ของกรดไขมันทั้งหมด (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

กรดไขมัน	ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด
กรดไมริสติก myristic acid (C14:0)	1.19
กรดปาลมิติก palmitic acid (C16:0)	22.03
กรดปาลมิโตเลอิก palmitoleic acid (C16:1)	31.48
กรดสเตียริก stearic acid (C18:0)	0.27
กรดโอเลอิก oleic acid (C18:1)	35.71
กรดไลโนเลอิก linoleic acid (C18:2)	8.62

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการหาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จาก 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว YM ค่าพีเอช 5.5 พบว่ายีสต์จากทั้ง 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์ หลังบ่ม 24 ชั่วโมงมีร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 100 จำนวนเซลล์ยีสต์จากคลัง lyophilized (MSCU 1058) มากกว่ายีสต์จากคลัง subcultured แต่ไม่มีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) หลังบ่ม 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์จากคลัง subcultured เจริญได้ดีที่สุดเมื่อค่าพีเอชของอาหารเป็น 6.5 (5.66×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และเจริญได้น้อยที่สุดในอาหารที่มีค่าพีเอช 7.0 (5.00×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แต่มีร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด คือ ร้อยละ 92.17 อย่างไรก็ตาม จำนวนเซลล์ทั้งหมดและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารที่มีค่าพีเอช 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นเช่นเดียวกันกับยีสต์จากคลัง lyophilized ที่เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีค่าพีเอช 7.0 (6.49×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และมีร้อยละของเซลล์ที่ชีวิตสูงที่สุดเมื่อค่าพีเอชของอาหารเป็น 6.5 (ร้อยละ 95.18) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) แม้ค่าพีเอชของอาหารจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดและร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตในยีสต์แต่ละคลังเชื้อจุลินทรีย์ แต่เมื่อเปรียบเทียบยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากทั้ง 2 คลังเชื้อจุลินทรีย์แล้ว พบว่ายีสต์จากคลัง lyophilized มีความสามารถในการเจริญและอยู่รอดได้ดีกว่ายีสต์จากคลัง subcultured การถ่ายโอนเชื้อหลายครั้ง อาจเป็นสาเหตุให้ความสามารถในการเจริญลดลง ดังนั้นจึงเลือกยีสต์จากคลัง lyophilized มาใช้ในการทดลองต่อไป และเนื่องจากผลของค่าพีเอชในอาหารเหลว YM ไม่ส่งผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ จึงเลือกใช้ค่าพีเอชที่ 5.5 ทำการทดลองต่อไป เพราะมีรายงานว่ายีสต์อุดมน้ำมันส่วนใหญ่ผลิตน้ำมันได้มากเมื่อค่าพีเอชเป็นกรด (Patel และคณะ, 2016)

การหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 (MSCU 1058) จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ค่าพีเอช 5.5 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน คือ 1.0×10^8, 5.56×10^8 และ 2.75×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าหลังการบ่มยีสต์ในอาหารผลิตน้ำมันนาน 6 วัน ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมันมากที่สุด คือ ร้อยละ 23.63 (กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) และ 3.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.56×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำมันภายในเซลล์รองลงมา คือ ร้อยละ 17.33 และร้อยละ 4.39 กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0×10^8 และ 2.75×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลผลิตน้ำมันรองลง คือ 0.98 และ 0.66 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.75×10^9 และ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เซลล์ยีสต์มีการเจริญมากที่สุด (22.33 กรัมต่อลิตร) เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.75×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีการเจริญน้อยที่สุด (3.86 กรัมต่อลิตร) เมื่อ

ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3) จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.56 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อหาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันต่อไป

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลังของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.56 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 วัน คือ ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมันสูงที่สุดเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 6 วัน ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมันน้อยที่สุดเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 8 วัน เนื่องจากการเจริญของยีสต์อุดมน้ำมันในระยะแรกจะใช้แหล่งอาหารเพื่อการเจริญ ทำให้มีการเจริญและเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential growth phase) ต่อมาเมื่อแหล่งไนโตรเจนขาดแคลนเซลล์จะเปลี่ยนมาใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อเก็บสะสมพลังงานสำรองในรูปของหยดน้ำมันหรือ TAG ภายในเซลล์ และเมื่อเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) หรือช่วงปลายของระยะสะสมน้ำมัน (late accumulation phase) เซลล์ยีสต์จะมีการสลายไขมันเกิดขึ้นร่วมกับการสะสมน้ำมันเล็กน้อย (Patel และคณะ, 2016) ดังนั้นระยะเวลาในการผลิตน้ำมันที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วงของการเจริญที่ยีสต์เริ่มเข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวคาดว่าเป็นระยะเวลา 6 วัน

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ที่เจริญในไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง พบว่ามีกรดโอเลอิก (ร้อยละ 35.7) กรดปาลมิโตเลอิก (ร้อยละ 31.48) และกรดปาลมิติก (ร้อยละ 22.03) เป็นองค์ประกอบหลัก ปริมาณของกรดปาลมิโตเลอิกที่ได้นี้สูงกว่าในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ที่เจริญในอาหารสังเคราะห์ที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ (Pranimit, 2017) ยีสต์อุดมน้ำมันที่เจริญในอาหารต่างกัน องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้แตกต่างกัน (Brar และคณะ, 2017) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ที่ผลิตได้นี้มีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งของกรดปาลมิโตเลอิกเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ และอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Axelsson M, Gentili F. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PLOS ONE* 2014; 9(2): 24.

Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, Franzosi, Bianchi D, Compagno C. Lipid production: second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis. Bioresource Technolgy* 2012; 111: 398-403.

Kischa S, Cheirsilp B. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *Energy Procedia* 2011; 274-282.

Luis A Garay, Kyria L, Bruce J. Accumulation of High-Value Lipids in Single-Cell Microorganisms: A Mechanistic Approach and Future Perspectives. *Agric Food Chem* 2014; 62(13): 2709-2727.

Passos ME, Alves HH, Momesso CM, Faria FG, Murata G, Cury-Boaventura MF, Hatanaka E, Massao-Hirabara S, Gorjão R. Differential effects of palmitoleic acid on human lymphocyte proliferation and function. *Lipids Health Dis* 2016; 15(1): 217.

Pranimit R. Isolation of yeast for oil production from sugarcane leaves hydrolysate. Master's Thesis, Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 2017.

Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Shima J. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Biotech* 2014; 153: 230-235.

Landry F, Chan CC, Huang Z, Leclair G, Li CS, Oballa R, Zhang L, Bateman K. Plasma-based approach to Measure target engagement for liver-targeting stearoyl-CoA desaturase 1 inhibitors. *Journal of Lipid Research* 2011; 52(8): 1494-149.

Patel A, Arora N, Sartaj K, Pruthi V, Pruthi PA. Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysate of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2016; 62: 836-855.

Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 90: 1219-1227.

Rox K, Jansen R, Loof TG, Gillen CM, Bernecker S, Walker MJ, Chhatwal GS, Müller R. Linoleic and palmitoleic acid block streptokinase-mediated plasminogen activation and reduce severity of invasive group A streptococcal infection. *Scientific Reports* 2017; 7(1): 11798.

Chang YH, Chang KS, Lee CF, Hsu CL, Huang CW, Jang HD. Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. In the batch cultures using corncob hydrolysate as carbon source. *Biomass and Bioenergy* 2015; 72: 95-103.

Schulze I, Hansen S, Groβhans S, Rudszuck T, Ochsenreither K, Syldatk C, Neumann A. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts – *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express* 2014; 4: 24.

Qin L, Liu L, Zeng AP, Wei D. From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology* 2017; 245: 1507-1519.

Brar KK, Sarma AK, Aslam M, Polikarpov I, Chadha BS. Potential of oleaginous yeast *Trichosporon* sp., for conversion of sugarcane bagasse hydrolysate into biodiesel. *Bioresource Technology* 2017; 242: 161-168.

กองโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค. ประเด็นสารรณรงค์วันหัวใจโลก พ.ศ. 2562. สืบค้นจาก http://www.thaincd.com/document/file/download/knowledge/ประเด็นสารรณรงค์วันหัวใจโลก_62.pdf. เข้าถึงเมื่อวันที่ 3 พฤษภาคม 2563.

ศูนย์โรคหลอดเลือดสมองพญาไท. ไขมันในเส้นเลือดสูง อันตรายและทำร้ายหลอดเลือดอย่างไร. สืบค้นจาก http://phyathaistrokecenter.com/info_view.php?inf_id=545. เข้าถึงเมื่อวันที่ 3 พฤษภาคม 2563.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. ตารางแสดงรายละเอียดมันสำปะหลัง. สืบค้นจาก http://www.oae.go.th/view/1/ตารางแสดงรายละเอียดมันสำปะหลัง/TH-TH. เข้าถึงเมื่อวันที่ 3 พฤษภาคม 2563.

ประกาศจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. เรื่อง ขยายเวลาการปิดที่ทำการเป็นการชั่วคราวเนื่องจากการระบาดของโรค COVID-19 (ฉบับที่ 2). 2563.

ประกาศสถานการณ์ฉุกเฉิน. ในทุกเขตท้องที่ทั่วราชอาณาจักร. ราชกิจจานุเบกษา. 2563; 137(68ง): 1.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลว YM (Yeast Malt Broth)

กลูโคส (glucose)	10 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	3 กรัม
เพปโทน (peptone)	5 กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000 มิลลิลิตร
ค่าพีเอช (pH)	5.5

อาหารแข็ง YM (Yeast Malt Agar)

กลูโคส (glucose)	10 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	3 กรัม
เพปโทน (peptone)	5 กรัม
ผงวุ้น (agar)	20 กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000 มิลลิลิตร
ค่าพีเอช (pH)	5.5

ไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch hydrolysate medium)

ไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch hydrolysate)	1,000 มิลลิลิตร
ค่าพีเอช (pH)	5.5

ภาคผนวก ข.

ตารางที่ ข1 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตจากแป้งมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
ไนโตรเจน (nitrogen)	ตรวจไม่ได้ (Non detect)
เหล็ก (iron)	0.11
แมงกานีส (manganese)	0.08
ทองแดง (copper)	< 0.10
สังกะสี (zinc)	0.14
แคลเซียม (calcium)	7.81
แมกนีเซียม (magnesium)	13.2
โพแทสเซียม (potassium)	25.0
ฟอสฟอรัสทั้งหมด (total phosphorus)	2.69