

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนทั่วไป ตามโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ผ่านการบริหารจัดการงบประมาณของกองบริการการวิจัยและหน่วยประสานงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ขอขอบคุณคุณภัทรพล วงษ์ภูธร และคุณรัตนพร เบ้าจันทาร สำหรับความช่วยเหลือในการวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับการอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นสำหรับการศึกษาวิจัย

รัตนภรณ์ ลีสิงห์
ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
กรกฎาคม 2556

หัวข้องานวิจัย	การผลิตไบโอดีเซลจากยีสต์ไขมันสูงที่แยกได้จากดินในพื้นที่เขตโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จ.ชัยภูมิ เมื่อใช้มันเทศเป็นวัตถุดิบ
หัวหน้าโครงการ	รัตนภรณ์ ลีสิงห์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

การศึกษาการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ *Torulaspora maleeae* Y30 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้น้ำตาลจากผงมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณเซลล์และลิปิดสูงสุดคือ yeast extract ที่ความเข้มข้น 1.25 และ 1.50g/L โดยได้ปริมาณเซลล์ 14.26 และ 16.09g/L อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 0.332(/d) และ 0.347 (/d) อัตราการผลิตเซลล์ 1.783g/L/d และ 2.012g/L/d ตามลำดับ ปริมาณลิปิด 4.05g/L และ 3.97g/L และอัตราการผลิตลิปิดที่ 0.506g/L/d และ 0.497g/L/d ตามลำดับ ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในรูป Fatty acid methyl esters (FAMES) พบว่า FAMES มีปริมาณค่าของกรดเท่ากับ 3.29 mgKOH/gFAME และปริมาณไบโอดีเซลร้อยละ 60.1 ของน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์

คำสำคัญ : มันเทศ ยีสต์ *Torulaspora maleeae* Y30 ไบโอดีเซล

Research Title Biodiesel production by the oleaginous yeast isolated from soil in plant genetic conservation areas of Chulabhorn Dam, Chaiyapoom using sweet potato root as carbon substrate

Researcher Dr. Ratanaporn Leesing
Department of Microbiology, Faculty of Science,
Khon Kaen University

Abstract

Study of growth and lipid production by yeast *Torulasporea maleeae* Y30 under batch cultivation by using sweet potato hydrolysate as carbon substrate was investigated. Effect of different nitrogen sources and concentrations were studied. Maximum growth and lipid accumulation was found when using yeast extract of 1.25 and 1.50g/L. A biomass of 14.26g/L and 16.09g/L with specific growth rate of 0.332 (/d) and 0.347(/d) and biomass production of 1.783g/L/d and 2.012g/L/d were obtained, respectively. Lipid yield of 4.05g/L and 3.97g/L with lipid production rate of 0.506g/L/d and 0.497g/L/d were found using 1.25g/L and 1.5g/L of yeast extract, respectively. Biodiesel or fatty acid methyl esters (FAMEs) production was investigated, the FAMEs yield of 6.1% from dried cell was found and acid value of 3.29 mgKOH/gFAMEs was obtained.

Keywords : sweet potato, *Torulasporea maleeae* Y30, biodiesel

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	22
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	42
บรรณานุกรม.....	45
ภาคผนวก	48
ประวัติและผลงานนักวิจัย.....	55

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 2.1	เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ.....8
ตารางที่ 2.2	แสดงสายพันธุ์ยีสต์ไขมันสูงและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้สูงสุด.....9
ตารางที่ 2.3	องค์ประกอบของลิปิดในยีสต์ไขมันสูงบางสายพันธุ์.....9
ตารางที่ 2.4	ชนิดของกรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์ต่างๆ.....10
ตารางที่ 2.5	เปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล (Huang et al., 2010)14
ตารางที่ 4.1	เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (biomass) ปริมาณการใช้น้ำตาล (consumed sugar) ปริมาณ ลิปิด (lipid, lipid content) อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ปริมาณผลได้ของเซลล์ (cell yield, $Y_{X/S}$) อัตราการผลิตลิปิด (Volumetric lipid production rate, Q_P) อัตราการผลิตเซลล์ (volumetric biomass production rate, Q_X) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>T. maleeae</i> Y30 ในอาหารเลี้ยง เชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่ง คาร์บอน ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง.....27
ตารางที่ 4.2	เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (biomass), ปริมาณการใช้น้ำตาล (consumed sugar) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ปริมาณผลได้ของ เซลล์ (cell yield, $Y_{X/S}$) อัตราการผลิตลิปิด (Volumetric lipid production rate, Q_P) อัตราการผลิต เซลล์ (volumetric biomass production rate, Q_X) และผลได้ของลิปิด (Lipid yield, $Y_{P/X}$) เมื่อ เพาะเลี้ยงยีสต์ <i>T. maleeae</i> Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ในแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง.....32
ตารางที่ 4.3	เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (biomass) ปริมาณการใช้น้ำตาล (consumed sugar) ปริมาณ ลิปิด (lipid, lipid content) อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ปริมาณผลได้ของเซลล์ (cell yield, $Y_{X/S}$) อัตราการผลิตลิปิด (Volumetric lipid production rate, Q_P) อัตราการผลิตเซลล์ (volumetric biomass production rate, Q_X) และผลได้ของลิปิด (Lipid yield, $Y_{P/X}$) เมื่อเพาะเลี้ยง ยีสต์ <i>T. maleeae</i> Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการ เพาะเลี้ยง.....38

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงการวัฏจักรของ citrate/malate cycle ในจุลินทรีย์ไขมันสูง, Enzymes : 1, pyruvate decarboxylase; 2, malate dehydrogenase; 3, malic enzyme; 4, pyruvate dehydrogenase; 5, citrate synthase; 6, ATP:citrate lyase; 7, citrate/malate translocase. (Ratledge, 2004).....	5
รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์กรดไขมันปาล์มิติกในไซโตพลาสซึม.....	6
รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์.....	7
รูปที่ 2.4 มันเทศ (sweet potato).....	12
รูปที่ 2.5 กระบวนการทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันสำหรับผลิตไบโอดีเซล (Fukuda et al., 2001).....	13
รูปที่ 2.6 ต้นทุนทั่วไปในการผลิตไบโอดีเซล (ดัดแปลงจาก Lim and Teong, 2010).....	14
รูปที่ 3.1 การเตรียมน้ำตาลจากหัวมันเทศและมันฝรั่ง มันเทศ/มันฝรั่งบดก่อนการย่อย (A) ภายหลังกการย่อย (B) ที่สภาวะต่างๆ และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศภายหลังกการแยกกากออกด้วยการปั่นเหวี่ยง (Hydrolysates).....	19
รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) ที่ได้จากการย่อยมันเทศด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) ภายใต้อุณหภูมิที่ขึ้นภายใต้ความดัน (autoclave) ที่ 121°C เป็นเวลา 20 นาที.....	22
รูปที่ 4.2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (biomass, g/L), ปริมาณลิปิด (lipid yield, g/L) และน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar, g/L) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>T.maleeae</i> Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ (sweet potato hydrolysate) และ potato hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอน.....	23
รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>T.maleeae</i> Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน.....	24
รูปที่ 4.4 ปริมาณเซลล์ (biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>T.maleeae</i> Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน.....	24

- รูปที่ 4.15 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ urea เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน.....31
- รูปที่ 4.16 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน.....31
- รูปที่ 4.17 เปรียบเทียบปริมาณการใช้น้ำตาล (Consumed sugar), ปริมาณเซลล์ (biomass), ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ในแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , Urea และ yeast extract ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง.....32
- รูปที่ 4.18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมี yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน.....33
- รูปที่ 4.19 ปริมาณเซลล์ (biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมี yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน.....34
- รูปที่ 4.20 ปริมาณลิปิด (lipid) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมี yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน.....34
- รูปที่ 4.21 ปริมาณลิปิด (lipid content) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมี yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน.....35
- รูปที่ 4.22 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 0.75 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน.....35
- รูปที่ 4.23 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 1.0g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน.....36
- รูปที่ 4.24 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มี

น้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 1.25g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน.....36

รูปที่ 4.25 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 1.50g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน.....37

รูปที่ 4.26 เปรียบเทียบปริมาณการใช้น้ำตาล (Consumed sugar) ปริมาณเซลล์ (biomass) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ในแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , Urea และ yeast extract ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง.....37

รูปที่ 4.27 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 1.50g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน.....39

รูปที่ 4.28 แสดงเซลล์แห้งของยีสต์ *T. maleeae* Y30 ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่แข็ง.....40

รูปที่ 4.29 การแยกชั้นของสารละลายในขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล (A) และน้ำมันยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในรูปของ FAME ที่ผลิตได้ (B).....41

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
g/L/d	มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร
rpm	รอบต่อนาที
°C	องศาเซลเซียส
μg	ไมโครกรัม
$Y_{x/s}$	ผลได้หรือผลผลิตเซลล์ (cell yield)
$Y_{p/x}$	ผลได้ของลิปิด (lipid yield)
%	ร้อยละ
Q_x	Volumetric biomass production rate อัตราการผลิตเซลล์
Q_p	Volumetric lipid production rate อัตราการผลิตลิปิด