บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทนที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน อย่างไรก็ดีไบโอดีเซลยังคงมีราคาสูงเนื่องจากราคาของวัตถุดิบที่มีประมาณ 75% ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการผลิตและใช้ประโยชน์ และการใช้น้ำมันพืชผลิตไบโอดีเซลทำให้การผลิตน้ำมันเพื่อการบริโภคลดลงและอาจขาดแคลนพืชอาหารเนื่องจากเกษตรกรหันไปปลูกพืชน้ำมันมากขึ้นปัจจุบันงานวิจัยการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ศึกษาในสาหร่ายขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากผลิตและสะสมลิปิดภายในเซลล์ได้สูงถึง 60-70% และลิปิดเป็นไตรกลีเซอไรด์ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันส่วนใหญ่คือ กรดปาลมิติก กรดโอเลอิคและกรดสเตียริกซึ่งมีความคล้ายกับน้ำมันจากเมล็ดพืช (Ratledge, 1981; Ratledge and James, 2002) ข้อได้เปรียบของยีสต์ในด้านการเพาะเลี้ยง คือ เจริญเร็ว ใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกได้ เช่น ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร น้ำตาลจากวัสดุเกษตรฯ (Vega et al, 1988; Papanikolaou et al., 2001; Xue et al, 2006) การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 แบบกะป๋อนเมื่อใช้กลูโคสพบว่าให้ลิปิดสูงถึง 67.5% โดยน้ำหนักแห้ง และน้ำมันที่สกัดได้ประกอบด้วยกรดปาลมิติก กรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดลิโนเลอิกและใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ (Li et al., 2007) ยีสต์ไขมันสูงไอโซเลท OYS3 เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณลิปิด 52.7% โดยน้ำหนักแห้ง และลิปิดมีกรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช (รัตนภรณ์, 2551) ยีสต์ไขมันสูงที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกจากตัวอย่างดินในพื้นที่อนุรักษ์พันธุกรรมพืชเขื่อนจุฬาภรณ์ ที่สามารถเจริญและให้ลิปิดสูงเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และอยู่ระหว่างการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีทั้งเซลล์และลิปิดสูงเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่การใช้กลูโคสทำให้ต้นทุนสูงซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการขยายขนาดการผลิตในเชิงพาณิชย์ ผลผลิตทางการเกษตรอื่นๆ เช่น มันเทศ (Sweet potato) ซึ่งเป็นพืชอีกชนิดที่มีการศึกษาเพื่อนำมาผลิตพลังงานทดแทน เช่น การหมักเป็นเอทานอลเนื่องจากมันเทศให้เปอร์เซ็นต์แป้งสูง ลักษณะเดียวกับมันสำปะหลัง แต่เป็นพืชล้มลุกเก็บเกี่ยวระยะสั้นประมาณ 90 วัน สามารถนำหัวมันเทศมาใช้ประโยชน์ได้ สามารถปลูกหมุนเวียนสูงถึงปีละ 2-3 ครั้ง โดยให้ผลผลิตเบื้องต้น 2-3 ตันไร่/ ดังนั้นมันเทศจึงเป็นพืชทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้ผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งไปที่การศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำมันจากยีสต์ไขมันสูงเมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นศึกษาการผลิตไบโอดีเซล (FAMEs) จากน้ำมันยีสต์ด้วยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อผลิตน้ำมันหรือลิปิดจากยีสต์ไขมันสูง *Torulaspora maleeae* Y30 ที่แยกได้จากดินในเขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ เมื่อใช้น้ำตาลจากมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนและศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันยีสต์

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้องค์ความรู้ใหม่ในการพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะการผลิตแบบบูรณาการระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์และสาหร่าย โดยข้อมูลที่จะนำไปสู่การวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันจุลินทรีย์ทั้งสาหร่ายขนาดเล็กและยีสต์

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.4.1 ศึกษาวิธีการย่อยมันเทศสดเพื่อให้ได้น้ำตาลเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์

1.4.2 เพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงเพื่อผลิตลิปิดด้วยการหมักแบบกะเมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ (sweet potato hydrolysate: SPH) เป็นแหล่งคาร์บอน

1.4.3 ศึกษาเบื้องต้นในการผลิตไบโอดีเซลจากเซลล์ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

1.5 สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

การผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตไบโอดีเซลนั้น สามารถเพาะเลี้ยงได้ 2 แบบ คือ การเพาะเลี้ยงเมื่อใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (heterotrophic cultivation) เช่น การเพาะเลี้ยงยีสต์และสาหร่ายบางสายพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงแบบสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย การเพาะเลี้ยง heterotrophic นั้นสามารถใช้สารอินทรีย์ได้หลากหลาย โดยทั่วไปใช้กลูโคส แต่กลูโคสทำให้ต้นทุนสูง ดังนั้นผลผลิตทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบเป็นแป้ง เช่น มันเทศ จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตลิปิดหรือน้ำมัน

กรอบแนวคิดในการศึกษาวิจัยคือ เพื่อศึกษาศักยภาพของการผลิตลิปิดหรือน้ำมันจากยีสต์ไขมันสูงเมื่อใช้ผลผลิตทางการเกษตรที่อายุการเพาะเลี้ยงสั้น คือ มันเทศ มาใช้เป็นสารตั้งต้นหรือวัตถุดิบ และศึกษาสมบัติของน้ำมันยีสต์ที่ผลิตได้

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การผลิตลิปิดในจุลินทรีย์ไขมันสูง

2.1.1 กลไกการผลิตลิปิดในจุลินทรีย์

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตลิปิดหรือไขมันและน้ำมันจากจุลินทรีย์กันอย่างแพร่หลาย และพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิปิดได้นั้นมีทั้งแบคทีเรีย รา ยีสต์และสาหร่ายขนาดเล็ก โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีข้อดีแตกต่างกันในการที่จะนำมาผลิตไขมันพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ ลิปิดที่ได้จากจุลินทรีย์จะเรียกว่าไขมันเซลล์เดียวหรือน้ำมันเซลล์เดียว (single cell oils: SCOs) ซึ่งมักเป็นน้ำมันที่บริโภคได้ (edible oil) มีองค์ประกอบคล้ายน้ำมันจากเมล็ดพืชโดยองค์ประกอบหลักคือไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol : TAG) ซึ่งจะอยู่ในรูปหยดน้ำมันเล็กๆ (microdroplet oil) ภายในเซลล์ จุลินทรีย์ที่ผลิตไขมันได้เรียกว่าเป็นจุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganisms) โดยลิปิดที่ผลิตได้ต้องมีปริมาณ 20% โดยน้ำหนักแห้งขึ้นไป ส่วนจุลินทรีย์ที่สะสมลิปิดภายในเซลล์น้อยกว่า 20% โดยน้ำหนักแห้ง เรียกว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง (non-oleaginous microorganisms) การผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์เริ่มต้นตั้งแต่ ค.ศ. 1980 เพื่อใช้ทดแทนน้ำมัน cocoa butter ที่มีการผลิตในปริมาณต่ำแต่ความต้องการสูง โดยยีสต์ *Rhodosporium toruloides* และ *Cryptococcus curvatus* ซึ่งผลิตกรดไขมันที่มีสมบัติคล้ายกับกรดไขมันใน cocoa butter คือ เป็นกลุ่มไตรกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยสเตียเรท (stearate) โอลิเอท (oleate) และปาลมิเตท (palmitate) (Ratledge, 1981; Ratledge, 1991; Ratledge, 2004)

ลิปิด (lipids) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไม่มีขั้ว (non-polar) เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform) อีเทอร์ (ether) ไดเอธิลอีเธอร์ (diethylether) ปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleumether) เบนซิน (benzene) และเฮกเซน (hexane) เป็นต้น และชนิดมีขั้วน้อย เช่น แอลกอฮอล์ อะซีโตน เป็นต้น ในโมเลกุลของลิปิดจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีลักษณะไม่มีขั้วมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) อยู่ในโครงสร้าง ลิปิดบางชนิดจะมีหมู่ที่มีขั้วซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilicity) ต่อกับส่วนไม่มีขั้ว ทำให้สมบัติลิปิดนั้นมีลักษณะเป็นแอมฟิไฟล์ (amphiphile or amphipathic molecule) ลิปิดทำหน้าที่ที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต เช่น เป็นโครงสร้างของเมมเบรนชนิดต่างๆ เป็นแหล่งพลังงาน และหน้าที่เฉพาะอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ ปัจจุบันมีการจำแนกชนิดของลิปิดออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ (ด้วง, 2534; ประหยัด, 2537) คือ

1) ลิปิดธรรมดา (simple lipids) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไขมัน (fats) และไข (waxes) ไขมันเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอลเมื่อเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องเรียกว่าน้ำมัน (oils) ส่วนไขเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับ monohydric alcohol

2) ลิปิดเชิงประกอบ (compound lipids) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และมีสารอื่นๆ รวมอยู่ด้วย ได้แก่ ฟอสฟอลิปิด (phospholipids) ไกลโคลิปิด (glycolipids)

3) อนุพันธ์ลิปิด (derived lipids) เป็นสารประกอบที่ได้จากการเกิดไฮโดรไลซีส (hydrolysis) ของลิปิดธรรมดาและลิปิดเชิงประกอบ ได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ สเตียรอยด์ คลอเลสเตอรอล คาโรตีนอยด์ เป็นต้น

การสะสมลิปิดในจุลินทรีย์ต้องเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนเกินพอและจำกัดปริมาณไนโตรเจน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมลิปิดจำนวนมากๆ ในเซลล์ต้องสามารถเข้าสู่การสังเคราะห์ลิปิดได้ทันที โดยจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ลิปิดต้องมีสมบัติดังนี้ มีความสามารถในการผลิต acetyl-CoA ได้อย่างต่อเนื่องภายในเซลล์ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน และมีความสามารถในการผลิต NADPH มากเพียงพอเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน การสังเคราะห์ acetyl-CoA ในจุลินทรีย์ไขมันสูงจะเกิดขึ้นเมื่อมีเอนไซม์ ATP:citrate lyase (ACL) ซึ่งจะไม่พบในจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง (Ratledge, 1981; Ratledge, 2004) ดังสมการที่ (1)

$$\text{Citrate} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acetyl-CoA} + \text{oxaloacetate} + \text{ADP} + P_i \qquad (1)$$

เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจะต้องมีกรดซิตริค (citric acid) ในปริมาณที่เพียงพอซึ่งกรดดังกล่าวผลิตได้จากวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิค (tricarboxylic acid cycle : TCA) ซึ่งเกิดขึ้นภายในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ โดยคุณสมบัติประการหนึ่งที่สำคัญของจุลินทรีย์ไขมันสูงคือสามารถสะสมกรดซิตริคภายในเซลล์ได้ดีเนื่องจากถูกควบคุมโดยกิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase เมื่อมี AMP (adenosine monophosphate) เกิดขึ้นใน TCA cycle โดยปริมาณความเข้มข้นของ AMP จะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ AMP deaminase (Ratledge,1991; Ratledge, 2004) ดังสมการที่ (2)

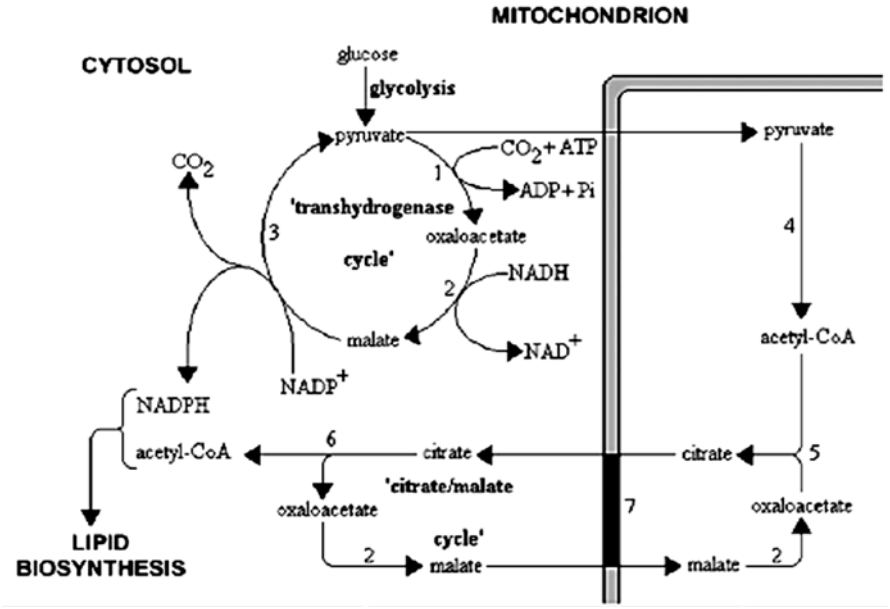
$$\text{AMP} \longrightarrow \text{inosine 5'-monophosphate} + \text{NH3} \qquad (2)$$

การสังเคราะห์ลิปิดของจุลินทรีย์จะเกิดได้ดีเมื่อมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะไปส่งเสริมการสร้าง acetyl-CoA เมื่อปริมาณไนโตรเจนจำกัดเซลล์จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ AMP deaminase เพิ่มขึ้นเป็น 5 เท่าของการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีการจำกัดไนโตรเจน การเพิ่มกิจกรรมของ AMP deaminase จะลดการสะสมของ AMP ภายในเซลล์และในไมโตรคอนเดรีย การลดลงของ AMP ในไมโตรคอนเดรียจะไประงับหรือหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ isocitatre dehydrogenase เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นกับปริมาณของ AMP ผลที่ได้คือ isocitatre จะไม่ถูกเปลี่ยนแต่จะสะสมภายในไมโตรคอนเดรียในรูปของ citrate จากนั้น citrate จะถูกส่งไปสู่ไซโตรพลาสซึม (cytosol) จากนั้นถูกสลายด้วยเอนไซม์ ATP:citrate lyase (ACL) ได้เป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate จากนั้น acetyl-CoA จะถูกนำไปสังเคราะห์กรดไขมัน ส่วน oxaloacetate จะถูกเปลี่ยนไปเป็น malate โดยเอนไซม์ malate dehydrogenase จากนั้นจะถูกส่งเข้าไปในไมโตรคอนเดรีย เพื่อทำหน้าที่ในการส่ง citrate จากไมโตรคอนเดรียออกสู่ไซโตรพลาสซึม (Ratledge, 2004) ดังรูปที่ 2.1

การสังเคราะห์กรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอมจำนวน 1 โมลต้องการ NADPH จำนวน 16 โมล แหล่งของ NADPH สำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันที่สำคัญคือเอนไซม์ malic ดังสมการที่ (3)

$$\text{Malate} + \text{NADP}^{+} \longrightarrow \text{pyruvate} + CO_2 + \text{NADPH} \qquad (3)$$

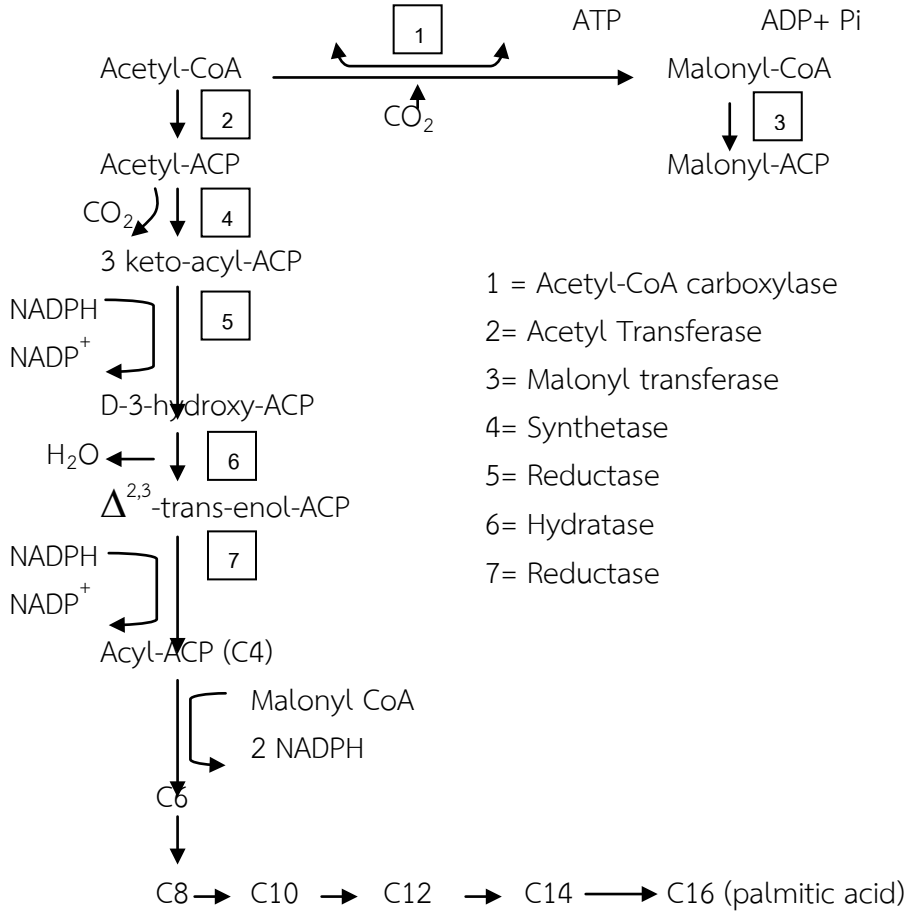
เอนไซม์ malic พบมากในจุลินทรีย์ไขมันสูง ซึ่งจะทำให้เกิด metabolon complex โดยประกอบด้วย ACL และ fatty acid synthase (FAS) เพื่อทำหน้าที่เปลี่ยน acetyl-CoA เป็นกรดไขมัน และจากนั้นกรดไขมันจะรวมกับกลีเซอรอลได้เป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลและสะสมในเมมเบรนของ endoplasmic recticulum ในรูปของ fatty acid droplets (C16 :0) จากนั้นมีการเพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมและเพิ่มพันธะคู่ได้เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวอย่างยิ่งยวดสายยาว (long chain polyunsaturated fatty acids: LCPUFAs) (Ratledge, 2004) การสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์จะเริ่มจากการสังเคราะห์กรดปาลมิติค (C16:0) จาก acetyl-CoA และ NADPH โดยเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม ส่วน acetyl-CoA ซึ่งอยู่ในไมโตรคอนเดรียจะถูกส่งออกมาที่ไซโตรพลาสซึมโดยอาศัย citrate จากนั้นเข้าสู่การสังเคราะห์กรดไขมันในไซโตพลาสซึมโดยการควบคุมของเอนไซม์ fatty acid synthase เริ่มจาก acetyl-CoA ทำปฏิกิริยากับ CO_2 ได้เป็น malonyl CoA โดยใช้พลังงานจาก ATP จากนั้น acetyl-CoA และ malonyl-CoA จะทำปฏิกิริยากับ Acyl carrier protein (ACP) ได้เป็น acetyl-ACP และ malonyl-ACP ซึ่งจะรวมกันได้ Acyl ACP (C4) และใช้ NADPH 2 โมเลกุล จากนั้นปฏิกิริยาจะดำเนินซ้ำแบบเดิมจำนวน 4 ขั้นตอน จนได้กรดปาลมิติค (Ratledge and Evans, 1989 ; Ratledge, 1991; Ratledge, 2004 ; Tehlivets et al., 2007) ดังรูปที่ 2.2



Net carbon balance: pyruvate ⟶ acetyl-CoA + CO_2

Net reaction for NADPH production: NADP + $NADP^+$ + ATP ⟶ NAD^+ + NADPH + P*i*

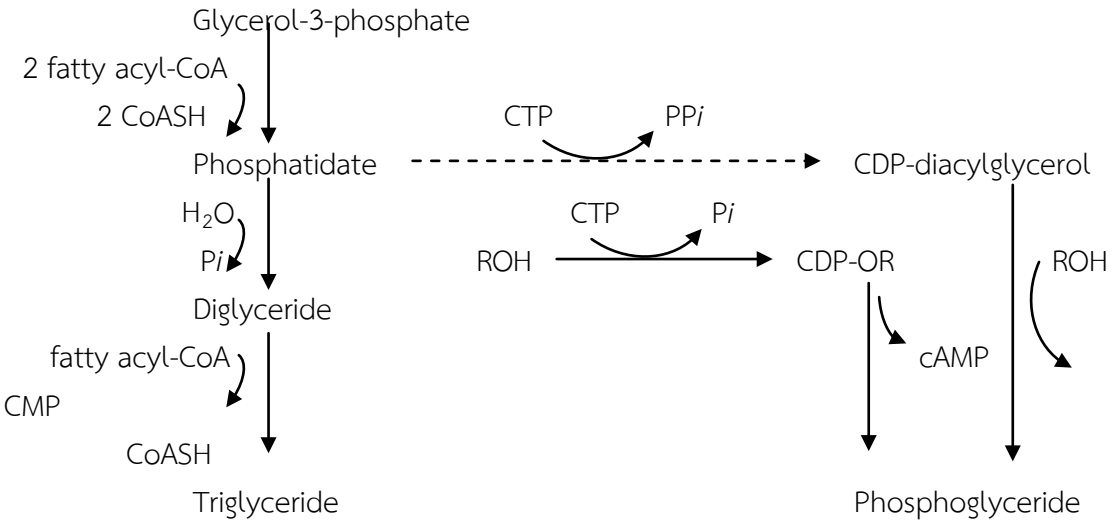
รูปที่ 2.1 แสดงการวัฏจักรของ citrate/malate cycle ในจุลินทรีย์ไขมันสูง, Enzymes : 1, pyruvate decarboxylase; 2, malate dehydrogenase; 3, malic enzyme; 4, pyruvate dehydrogenase; 5, citrate synthase; 6, ATP:citrate lyase; 7, citrate/malate translocase. (Ratledge, 2004)



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์กรดไขมันปาลมิติคในไซโตพลาสซึม
ที่มา ดัดแปลงจาก Ratledge and Evans, 1989

กรดไขมันที่สิ่งมีชีวิตสังเคราะห์ขึ้นมาส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคาร์บอน 16 หรือ 18 อะตอม จากนั้นกรดไขมันเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเอนไซม์ desaturases และ elongases การเพิ่มพันธะคู่ในกรดไขมันจะเริ่มจาก palmitoyl-CoA (palmitic acid, C16 :0) เปลี่ยนเป็น stearoyl-CoA (C18 :0) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น oleoyl-CoA (oleic acid, C18 :1) การเพิ่มพันธะคู่ในกรดไขมันจะมีปฏิกิริยา chain elongation โดยเอนไซม์ elongase ทำหน้าที่เพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมและ desaturation โดยเอนไซม์ desaturase ทำหน้าที่ในการเพิ่มหรือเติมพันธะคู่ตามลำดับ จากนั้นกระบวนการก็จะดำเนินการในการเพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมและพันธะคู่ไปเรื่อยๆ จนได้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (LCPUFAs) การสร้างพันธะคู่ในกรดไขมันโดยการใช้ออกซิเจนและอาศัย electron transport system เรียกระบบนี้ว่า microsomal desaturase system เช่น palmitoyl-CoA (C16:0) เปลี่ยนเป็น palmitoleyl-CoA (C16:1) โดยอาศัยออกซิเจนและ NADPH โดยปฏิกิริยานี้เกิดใน endoplasmic reticulum ยีสต์มีแนวโน้มในการผลิตเพียง mono-unsaturated fatty acid และ di-unsaturated fatty acid ของ C16 และ C18 (Ratledge and Evans, 1989; Ratledge, 2004)

กรดไขมันที่สังเคราะห์ได้ในจุลินทรีย์จะเก็บสะสมในรูปของไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์ เนื่องจากกรดไขมันละลายน้ำได้ยากและจะอยู่ในรูปไมเซลล์ (micelle) อีกทั้งคุณสมบัติของการเป็นกรดและเป็น oxidizing agent ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ จึงสร้างพันธะเอสเทอร์กับสารประกอบอื่นๆ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลีเซอรอล ได้เป็นกลีเซอไรด์ โดย fatty acyl-CoA รวมตัวกับ glycerol-3-phosphate เกิดเป็น phosphatidate เมื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกไปจะได้กลีเซอไรด์ซึ่งสามารถรวมตัวกับสารอื่น เช่น โคลีน (choline) ซีรีน (serine) และอิโนซิทอล (inositol) กลายเป็นฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) แต่การรวมตัวกันนั้น phosphatidate จะถูกเปลี่ยนไปเป็นรูป active form ในรูปอนุพันธ์ของ cytidine diphosphate (CDP) คือ CDP-diacylglycerol แล้วจึงรวมกับสารอื่นๆ (Ratledge and Evans, 1989; Ratledge, 2004) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์
ที่มา ดัดแปลงจาก Ratledge and Evans (1989)

2.1.2 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตน้ำมันชีวภาพ

คุณสมบัติโดยทั่วไปของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมไม่แตกต่างจากจุลินทรีย์ที่ผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ ในระดับอุตสาหกรรม กล่าวคือ จุลินทรีย์ต้องมีความเสถียรทางพันธุกรรมนั่นคือให้ผลิตภัณฑ์คงที่เมื่อใช้ผลิตสารนั้นๆ เป็นเวลานานๆ จุลินทรีย์ต้องไม่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic microorganisms) หรือผลิตสารพิษซึ่งทั้งสองลักษณะต้องปลอดภัยต่อผู้ทำงานในโรงงานที่ผลิตและปลอดภัยต่อการนำไปเป็นส่วนประกอบของอาหารคน อาหารสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ยา สำหรับการหมักแบบต้องการอากาศ (aerobic fermentation) จุลินทรีย์นั้นต้องมีความทนต่อแรงเฉือนจากการกวน การให้อากาศและการผสมผสาน จุลินทรีย์ต้องมีอัตราการเจริญสูงและให้ผลิตภัณฑ์สูง และคุณสมบัติที่พึงประสงค์อย่างยิ่งของจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาผลิตน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมมีดังนี้ มีความสามารถในการสะสมลิปิดในปริมาณสูง สามารถเจริญแบบ heterotrophic growth กรณีที่จุลินทรีย์นั้นคัดแยกมาจากน้ำทะเลต้องสามารถเจริญได้ดีในที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำๆ สามารถเจริญและให้ผลผลิตได้ในที่มีอุณหภูมิสูงมากกว่า 30°C ผลิตและสะสมลิปิดเป็นส่วนประกอบหลัก และลิปิดที่

ได้ต้องอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์และน้ำมันที่ผลิตได้ต้องสามารสกัดออกจากเซลล์ได้ง่าย (Ratledge, 2004)

2.1.3 ลิปิดที่พบในยีสต์

ยีสต์ (yeast) คือ รากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รีสามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาว ฝรั่ง เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ในน้ำ ในส่วนต่างๆของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลงและในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่ยีสต์อยู่บ่อยๆคือแหล่งที่มีน้ำตาลตวามเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมักจะปนลงไปในอาหาร เป็นเหตุให้อาหารเน่าเสียได้ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต ยีสต์มีการใช้ในอุตสาหกรรมมานาน เช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein : SCP) ใช้ในการผลิตขนมปัง การผลิตแอลกอฮอล์ผ่านกระบวนการหมัก เป็นต้น สำหรับยีสต์หลายสายพันธุ์พบว่ามีการสะสมลิปิดภายในเซลล์ได้ในปริมาณสูงถึง 60-70 % และข้อได้เปรียบของยีสต์คือสามารถเจริญได้เร็วและเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายโดยการปั่นเหวี่ยง ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงและมีการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ตัวอย่างยีสต์ไขมันสูง เช่น *Yarrowia lipolytica, Cryptococcus* sp., *Rhodotolura* sp. และนอกจากนั้นน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์มีคุณสมบัติของ triacylglycerol fraction คล้ายกับน้ำมันพืชโดยเฉพาะน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus curvatus (Candida curvata* D) (Meesters et al., 1996; Gill et l., 1997; Li et al., 2007)

กรดไขมันที่ผลิตโดยยีสต์ส่วนใหญ่เป็น C16 และ C18 โดยสะสมอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) หรือไตรเอซิลกลีเซอไรด์ (triacylglyceride) นอกนั้นจะอยู่ในรูปฟอสฟอลิปิด (phospholipids) สเตียรอล (sterol) และเอสเทอร์ของสเตรียรอล (sterol ester) ซึ่งโดยทั่วไปจะเห็นว่าลิปิดที่ได้จากยีสต์เหล่านี้มีองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายกับน้ำมันพืช ดังตารางที่ 2.1 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเอาน้ำมันจากยีสต์มาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนอีกแหล่งหนึ่งนอกเหนือจากพืชน้ำมัน นอกจากนั้นแล้วยีสต์และเชื้อรายังมีคุณสมบัติอื่นๆ ที่เหมาะสมในการที่จะคัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในการผลิตลิปิด คือ สามารถเจริญได้เร็วให้ความหนาแน่นของเซลล์สูง (high cell density) ให้ผลผลิตสูง นอกจากนั้นยังสามารถใช้วัตถุดิบราคาถูกในการเจริญ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่าย เช่น โดยการกรองหรือการปั่นเหวี่ยง การสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ทำได้ง่าย (Rotledge and Tan,1990)

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

แหล่งของลิปิด	ร้อยละของกรดไขมันที่พบ								
	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0
Candida 107	2	3	37	1	11	35	8	0	3
Rhodotorula gracilis	0	1	18	1	6	41	24	1	9
Palm oil	2	3	37	2	6	38	10	0	0
Soybean oil	0	0.1	10.5	0	3.2	22.3	54.5	8.3	0.2
Sunflower oil	0	0.1	6.7	0	2	12.9	77.5	0	0.5
Olive oil	0	0	16.9	1.8	2.7	61.9	14.8	0.6	0.4

ลิปิดที่พบในยีสต์ (intracellular lipid) ส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ที่เซลล์เมมเบรน แต่ใน oleaginous yeast จะพบว่าลิปิดอยู่ในรูปหยดไขมัน (fat droplet) หรือหยดน้ำมัน (oil droplet) อยู่ภายในเซลล์ ลิปิดที่พบในยีสต์ประกอบด้วยกลีเซอไรด์ (glyceride) ฟอสฟอลิปิด (phospholipids) ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สฟิงโกลิปิด (sphingolipids) และสเตียรอยด์ (steroid compound) ตัวอย่างยีสต์ไขมันสูงแสดงดังตารางที่ 2.2 ชนิดและปริมาณของลิปิดที่พบจะแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ยีสต์ สารอาหาร และสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ pH เป็นต้น (Rotledge and Tan,1990) โดยลิปิดที่พบในยีสต์แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 แสดงสายพันธ์ยีสต์ไขมันสูงและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้สูงสุด

สายพันธุ์ยีสต์	**ปริมาณน้ำมันสูงสุด (%โดยน้ำหนักแห้ง)**
Candida curvata D	58
Cryptococcus albidus var. *albidus*	65
Endomycopsis vernalis	65
Lipomyces lipoter	64
Lipomyces starkeyi	63
Rhodosporidium glutinis	72
Yarrowia lipolytica	36

ที่มา : Rotledge and Tan (1990)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของลิปิดในยีสต์ไขมันสูงบางสายพันธุ์

สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณและชนิดของลิปิด (%โดยน้ำหนักแห้ง)							
	TG	DG	MG	FFA	S	SE	PL	G
Cryptococcus albidus	92	2.5	1	3	1	1	2	-
Lipomyces stakeyi	95	1	-	<1	1	-	3	-
Rhodotorula glutinis	67	-	-	4	2	7	11	6
Tricosporon pullulans	82	1	-	-	10	1	4	-

TG: Triglyceride, DG: diglyceride, MG: monoglyceride, FFA: free fatty acid, S: sterol, SE: sterol ester, PL: phospholipids, G: glycolipid

ที่มา : Rotledge and Tan (1990)

กลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลจะถูกแทนที่ด้วยกรดไขมันตั้งแต่ 1, 2 และ 3 ตำแหน่ง ซึ่งเรียกว่า โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ ตามลำดับ โดยกลีเซอไรด์เป็นลิปิดที่พบมากที่สุดในเซลล์คือ มีถึง 80 % ของลิปิดทั้งหมด และกลีเซอไรด์ที่พบมากที่สุดคือ ไตรกลีเซอไรด์ โดยกรดไขมันที่พบในไตรกลีเซอไรด์ในยีสต์ที่พบมีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 8-24 อะตอม โดยชนิดที่มีคาร์บอนอะตอม 16-18 อะตอม (C16, C18) พบมาก

ที่สุดโดยมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว โดยองค์ประกอบของลิปิดในยีสต์ไขมันสูงแสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ชนิดของกรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์	ปริมาณของกรดไขมัน (% โดยน้ำหนักแห้ง)										
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	18:4	20:0	22:0	23:0	24:0
Candida 107	44	5	8	31	9	1	-	-	-	-	-
Candida curvata	25	-	10	57	7	-	-	-	-	-	-
Cryptococcus albidus	16	1	3	56	-	3	-	7	12	-	-
Lipomyces lipoter	37	4	7	48	3	-	-	-	-	-	-
Rhodosporidium toruloides	18	3	3	66	-	-	-	-	-	3	6
Rhodotorula glutinis	10	9	-	19	44	16	-	-	-	-	-
Trichosporon ceutanium	13	-	22	50	-	-	-	-	-	-	-

ที่มา : Rotledge and Tan (1990)

2.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium/nutrients) สารอาหารหลักที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์ คือ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่ผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ จะแตกต่างกัน เช่น ยีสต์ *Candida* 107 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณลิปิด 42 % โดยน้ำหนัก และกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่คือ กรดปาลมิติก (C16 :0) และกรดโอเลอิค (C18 :1) ในขณะที่เมื่อเจริญบนอาหารที่มี Hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณลิปิด 19 % โดยน้ำแห้ง และกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่คือ กรดลิโนเลอิค (C18 :2) ยีสต์ *Cryptococcus albidus* var. *albidus* เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคสและไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และ NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$,Urea เป็นแหล่งไนโตรเจน พบกรดโอเลอิก (C18 :1) เป็นองค์ประกอบหลักของกรดไขมันที่พบ

2) pH ระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอยู่ที่ 7-9 การให้คาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงอาจทำให้ pH ขึ้นถึง 9 ยีสต์เจริญได้ดีในอาหารที่มี pH 4.5-5.5

3) การกวนและการผสมผสาน (Aeration and mixing) เมื่อมีการให้อากาศเพิ่มขึ้นพบว่ายีสต์มีการผลิตเซลล์และปริมาณลิปิดเพิ่มขึ้น อุณหภูมิลดลงพบว่าจะมีผลทำให้ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีปริมาณเพิ่มขึ้น การกวนทำให้เกิดการผสมผสานอย่างทั่วถึงระหว่างเซลล์สาหร่ายและอาหารเลี้ยงเชื้อและเพื่อป้องกันการตกตะกอนและให้เซลล์สาหร่ายได้รับแสงในปริมาณเท่าๆ กัน และเพื่อป้องกันการสะสมของความร้อนในระบบและลดการสะสมของออกซิเจน

4) ระยะเวลาและระบบการเพาะเลี้ยง การเลี้ยงยีสต์ด้วยการหมักแบบกะพบว่ายีสต์เมื่อเข้าสู่ช่วงท้ายของการเจริญ (growth phase) พบว่าเซลล์มีการผลิตและละสมลิปิดสูงสุด โดยปกติเมื่อเซลล์ผลิตลิปิดจะให้ปริมาณเซลล์ (biomass) ต่ำ ดังนั้นเพื่อเพิ่มการผลิตเซลล์และลิปิดให้สูงขึ้นจึงมีมีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกะป้อน (fed-batch cultivation) โดยเป็นระบบที่ผลดีทั้งปริมาณเซลล์และลิปิดในเวลาเดียวกันโดยไม่มีผลของการยับยั้งการเจริญของสารอาหารที่มีความเข้มข้นสูง

การเพาะเลี้ยงยีสต์*C. curvatus* ด้วยการหมักแบบกะป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 53% ในเวลา 172 ชั่วโมง น้ำมันที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดโอเลอิก กรดปาลมิติกและกรดสเตียริก (Hassan et al, 1996) ยีสต์ *Rhodotorula glutinis* IIP-30 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหมักแบบกะป้อนภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจนให้ผลผลิตลิปิดสูงสุด 66% โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และ pH 4.0 (Johnson et al., 1992) เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Candida curvata* ในน้ำสกัดจากกล้วยด้วยการหมักแบบกะป้อนพบเซลล์มีอัตราการเจริญสูงและมีการสะสมลิปิด 30% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Vega et al, 1988)

ยีสต์ *R. toruloides* มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 76% ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 70 กรัม/ลิตร (Li et al, 2006) รายงานการศึกษาการผลิตลิปิดของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula glutinis, Candida utilis, Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผงชูรสพบว่า *R. glutinis* มีการเจริญและสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์และน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์เมื่อผ่านกระบวนการ transesterification แล้วมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลได้)Xue et al, 2006 (การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 ในการหมักแบบกะป้อนเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเซลล์สะสมลิปิดสูงถึง 67.5% โดยน้ำหนักแห้ง และให้ผลผลิตลิปิด (lipid productivity) เท่ากับ 0.54 กรัมลิปิด/ลิตร/ชั่วโมง และน้ำมันที่สกัดได้ประกอบด้วยกรดไขมันหลักๆ คือ กรดปาลมิติก กรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดลิโนเลอิก ซึ่งใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ (Li et al., 2007) ยีสต์ไอโซเลท OYS3 เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 90 กรัม/ลิตร ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน อุณหภูมิ 30°C ให้ปริมาณลิปิดที่ 4.10 กรัมลิปิด/ลิตรหรือ 52.7% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่ามีกรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลัก เช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช (รัตนภรณ์, 2551) Huang และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตน้ำมันจากยีสต์ *Trichosporon fermentus* เมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยฟางข้าว (rice straw hydrolysate) พบว่ายีสต์ให้ปริมาณลิปิดสูง 41% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.2 มันเทศ (Sweet potato)

มันเทศเป็นพืชที่เป็นเถาเลื้อยราบไปบนพื้นดิน (รูปที่ 2.4) มีรากสะสมอาหารขยายใหญ่เรียกว่าหัว หัวมันเทศมีปริมาณคาร์โบไฮเดรทสูง มันเทศนอกจากใช้เป็นอาหารของมนุษย์แล้วยังใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ทั้งหัว เถาและใบ ทั้งยังเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมได้หลายอย่าง เช่น อุตสาหกรรมแป้ง แอลกอฮอล์ และน้ำส้ม เป็นต้น

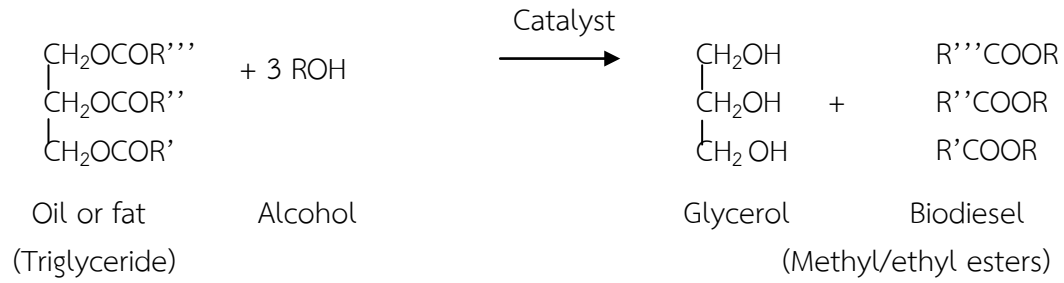
มันเทศเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญอันดับที่ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวเจ้า ข้าวโพด และมันฝรั่ง ในประเทศไทยเราแม้จะปลูกมันเทศกันทั่วๆ ไป แต่ไม่ไม่ใช่อาหารหลักเพราะมีข้าวเจ้าเป็นอาหารหลักอยู่แล้ว มันเทศนับว่าเป็นพืชที่เหมาะกับดินฟ้าอากาศของประเทศไทยเพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตของหัวค่อนข้างสูง มันเทศ ปลูกได้ปีละ 2 ครั้ง คือ ในฤดูฝนตั้งแต่กลางเดือนพฤษภาคม ถึงกลางเดือนมิถุนายน และอีกครั้งหนึ่งหลังฤดูฝน คือ ในราวเดือนกันยายน ถึงพฤศจิกายน ในปี พ.ศ. 2516 ประเทศต่างๆ ทั่วโลก ผลิตมันเทศได้รวมกัน 133 ล้านตัน ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนผลิตได้มากที่สุด คือ ผลิตได้ 111 ล้านตัน บราซิล 2.3 ล้านตัน อินโดนีเซีย 2.1 ล้านตัน ญี่ปุ่น 2.0 ล้านตัน สาธารณรัฐเกาหลี 1.6 ล้านตัน สำหรับประเทศไทยในปีเดียวกันผลิตมันเทศเพียง 2.8 แสนตันเท่านั้น (http://kanchanapisek.or.th)

รูปที่ 2.4 มันเทศ (sweet potato)
ที่มา http://alangcity.blogspot.com/2013/02/blog-post_8.html

2.3 ไบโอดีเซล (biodiesel)

การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันไตรกลีเซอไรด์ทำได้โดยนำน้ำมันมาผ่านวิธีทรานเอสเทอริฟิเคชั่น โดยการเติมแอลกอฮอล์และมีกรดหรือด่างหรือเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนลิปิดหรือน้ำมันให้เป็นไบโอดีเซลในรูปเมทิลเอสเตอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl esters: FAMEs) และมีกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ (รูปที่ 2.5) (Siler-Marinkovic and Tomasevic, 1998; Vicente et al., 2004) การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเกิดขึ้น 3 ขั้นตอน โดยไตรกลีเซอไรด์เริ่มทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ได้ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และเอสเทอร์ จากนั้นไดกลีเซอไรด์ที่ได้ทำปฏิกิริยาต่อกับแอลกอฮอล์ ได้เป็นโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) และเอสเทอร์ และสุดท้ายโมโนกลีเซอไรด์ทำปฏิกิริยาต่อกับแอลกอฮอล์ได้กลีเซอรอลกับเอสเทอร์ ดังนั้นเพื่อให้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จะใช้แอลกอฮอล์ 3 โมลต่อไตรกลีเซอไรด์ 1 โมล และได้กลีเซอรอล 1โมลและเอสเทอร์ 3 โมล ซึ่งปฏิกิริยาทั้ง 3 ปฏิกิริยา เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับได้ (reversible reaction) และการใช้แอลกอฮอล์ที่มากเกินพอจะช่วยให้ปฏิกิริยาเลื่อนไปข้างหน้าและเพิ่มการเกิดเอสเทอร์หรือไบโอดีเซล การใช้แอลกอฮอล์ในปริมาณที่มากเกินพอพบว่าจะทำให้ได้ปฏิกิริยาไปข้างหน้าเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่งเทียม (Pseudo-first order) และปฏิกิริยาย้อนกลับเป็นปฏิกิริยาอันดับสอง

การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชโดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเมื่อใช้กระบวนการที่มีการใช้กรดและด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมกัน (Transesterification double step process, TDSP) ทำให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์มากกว่าการใช้ตัวเร่งเพียงชนิดเดียว (Samios et al., 2009) การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชด้วยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเมื่อใช้อัลกอฮอล์ชนิดต่างๆ และการใช้คลื่นอัลตราโซนิคและการกวนผสม พบว่าอัตราการเปลี่ยนน้ำมันพืชเป็นไบโอดีเซล (FAME) ขึ้นกับชนิดของอัลกอฮอล์โดยเมทานอลและเอทานอลให้อัตราการเปลี่ยนสูงกว่าการใช้อัลกอฮอล์ชนิดอื่น และการใช้คลื่นอัลตราโซนิคทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่าการใช้การกวนผสม (Hanh et al, 2009) การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชโดยใช้ไบโอเอทานอลทดแทนเมทานอล พบว่าได้ไบโอดีเซล 98.04% เมื่อใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ 35C, และไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีค่า acid value, peroxide value และความหนืดเพิ่มขึ้น ส่วนค่า iodine value ลดลงเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน 12 เดือน (Bouiad et al., 2009)



รูปที่ 2.5 กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสำหรับผลิตไบโอดีเซล (Fukuda et al., 2001)

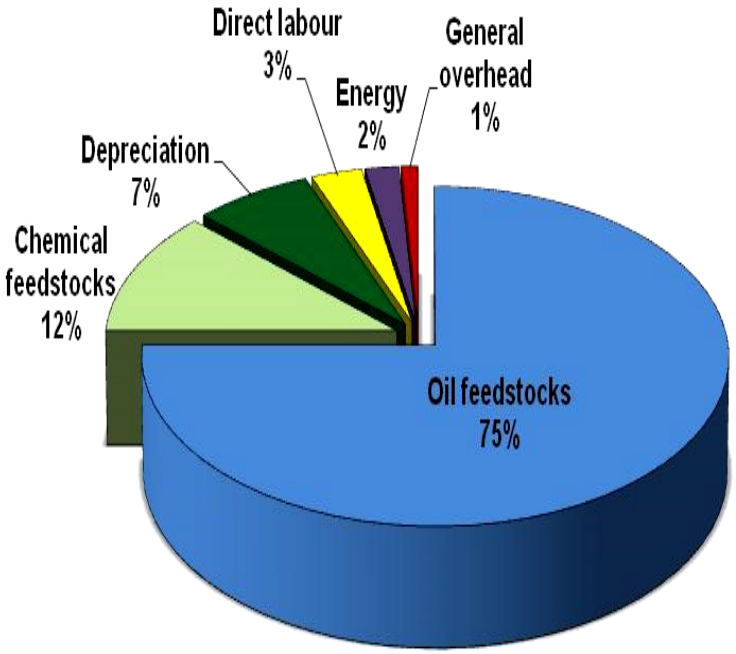
วัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันได้แก่ น้ำมันพืช ไขมันสัตว์และน้ำมันสัตว์ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกใช้วัตถุดิบ คือ ราคา ปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันพืชชนิดนั้น ๆ รวมทั้งความเหมาะสมของปริมาณการปลูกพืชน้ำมันในพื้นที่นั้นด้วย เช่น ปาล์มน้ำมันและมะพร้าวเป็นพืชน้ำมันที่ปลูกมากในประเทศไทย ถั่วเหลืองปลูกมากในสหรัฐอเมริกา แรพและทานตะวันปลูกมากในกลุ่มประเทศยุโรป ประเทศไทยมีการปลูกพืชน้ำมันหลัก 6 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว ถั่วลิสง งา และละหุ่ง โดยปาล์มน้ำมันปลูกมากที่สุด รองลงมาคือ มะพร้าว นอกจากนั้นยังมี สบู่ดำ น้ำมันสัตว์และน้ำมันพืชใช้แล้ว วัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลในไทยในปัจจุบัน คือ ปาล์มน้ำมัน สบู่ดำ และน้ำมันพืชใช้แล้ว ประเทศสหรัฐอเมริกานิยมใช้น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันใช้แล้ว (waste cooking oil) เป็นวัตถุดิบ

ไบโอดีเซลส่วนใหญ่ผลิตจากน้ำมันพืช เช่น น้ำมันเมล็ดแร็พ (rapeseed oil) ใช้ผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด (59%) รองลงมาเป็นน้ำมันถั่วเหลือง (25%) และน้ำมันปาล์ม (10%) น้ำมันพืชอื่นๆ เช่น น้ำมันเมล็ดทานตะวัน ไบโอดีเซลมีคุณสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซลและใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้ จำนวนคาร์บอนในดีเซลประมาณ 15 อะตอมส่วนน้ำมันพืชมีคาร์บอน 14-18 อะตอม อย่างไรก็ดีราคาไบโอดีเซลยังสูงกว่าดีเซลประมาณ 2 เท่า ต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลมาจากวัตถุดิบน้ำมันพืชและกระบวนการผลิต ราคาวัตถุดิบประมาณ 60-75% ของต้นทุนรวมทั้งหมด ถึงแม้จะใช้น้ำมันพืชใช้แล้ว (รูปที่ 2.6) ปัญหาหนึ่ง ของการใช้น้ำมันพืชใช้แล้วคือกรดไขมันอิสระ(free fatty acid, FFA) มีปริมาณสูงทำให้ยากต่อการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (Haas, 2005) ดังนั้นการเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมจึงลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลได้

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลแบ่งได้เป็นรุ่นที่หนึ่ง (first generation biodiesel feedstocks) เป็นวัตถุดิบกลุ่มแรกที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เมล็ดแรพ น้ำมันปาล์ม โดยมากกว่า 95% เป็นน้ำมันบริโภคได้ (edible oil) ทำให้เกิดปัญหาด้านราคาและปริมาณสำรองของพืชอาหาร

วัตถุดิบรุ่นที่สอง (second generation biodiesel feedstocks) เป็นกลุ่มน้ำมันที่บริโภคไม่ได้ (non-edible oil) หรือไม่ใช่พืชอาหาร (non-food feedstocks) เช่น สบู่ดำ (jatropha) น้ำมันโจโจบา (jojoba oil) น้ำมันพืชใช้แล้วก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ข้อดีของวัตถุดิบกลุ่มนี้ คือ ลดการแข่งขันกับพืชอาหาร ปลูกร่วมกับพืชอื่นได้และปลูกในที่ดินที่ปลูกพืชอาหารไม่ได้

วัตถุดิบรุ่นที่สาม (Third generation biodiesel feedstocks) เป็นกลุ่มน้ำมันจากจุลินทรีย์ (microbial oil) ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ไขมันสูงหรือกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำมันได้สูง (oleaginous microorganisms) เช่น ยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeast) และสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เป็นทางเลือกที่ดีในการแก้ปัญหาของวัตถุดิบรุ่นที่หนึ่งและสอง



รูปที่ 2.6 ต้นทุนทั่วไปในการผลิตไบโอดีเซล (ดัดแปลงจาก Lim and Teong, 2010)

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล (Huang et al., 2010)

แหล่งน้ำมัน	ข้อดี	ข้อด้อย
น้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal oils)	1) มีกรดไขมันที่เหมือนกับน้ำมันพืช 2) เมื่อสภาวะเพาะเลี้ยงเหมาะสมจะสะสมน้ำมันสูง 85% ของน้ำหนักแห้ง 3) ระยะเวลาเพาะเลี้ยงสั้น	1) ลิปิดจากสาหร่ายส่วนใหญ่ค่าพลังงานต่ำกว่าเชื้อเพลิงดีเซล 2) ต้นทุนเพาะเลี้ยงสูงเมื่อเทียบกับพืชน้ำมัน
น้ำมันยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeast oils)	1) มีหลายหลายสายพันธุ์ในธรรมชาติ 2) ปริมาณน้ำมันในเซลล์สูง 3) ระยะเวลาเพาะเลี้ยงสั้น	1) วิธีสกัดน้ำมันยุ่งยากมากกว่าและต้องพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ 2) ต้นทุนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมัน
น้ำมันพืชใช้แล้ว	1) ราคาถูกเมื่อเทียบพืชน้ำมัน	1) FFA สูงซึ่งเป็นปัญหาในการผลิตไบโอดีเซล

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Angerbauer และคณะ (2008) ศึกษาศักยภาพในการสะสมลิปิดของยีสต์ *Lipomyces starkeyi* เมื่อเจริญในน้ำเสีย (sewage sludge) พบว่าการสะสมลิปิดจะขึ้นอยู่กับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N-ratio) โดย C/N-ratio 150 และ pH 5.0 จะมีปริมาณลิปิดสูงสุด 68% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่าการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำเสียจะไม่มีผลกระทบต่อการเจริญและการสะสมลิ

ปิด โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิปิดที่ได้เมื่อเลี้ยงบนอาหาร basal medium และบน sewage sludge พบว่าปริมาณการสะสมลิปิดไม่แตกต่างกันนัก ลิปิดที่ผลิตได้จากยีสต์ *Lipomyces starkeyi* ที่เจริญบนน้ำเสียประกอบด้วยกรดไขมัน ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้

รายงานการวิจัยพบว่ายีสต์บางกลุ่มมีอัตราการเจริญสูงและมีความสามารถในการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ตัวอย่างยีสต์ที่สะสมลิปิดสูง เช่น *Yarrowia lipolytica, Cryptococcus* sp., *Rhodotolura* sp. (Muniglia et al, 2005; Tehlivets et al, 2007) และน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์มี triacylglycerol เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งคล้ายกับน้ำมันพืชโดยเฉพาะน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus curvatus (Candida curvata* D) (Moon et al, 1978) การเพาะเลี้ยงยีสต์ *C. curvatus* ด้วยการหมักแบบกะป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 53% ในเวลา 172 ชั่วโมง ที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 75 และน้ำมันที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดโอเลอิก กรดปาลมิติกและกรดสเตียริก (Hassan et al, 1996)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida* 107 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสด้วยการหมักแบบต่อเนื่องในระบบ single-state continuous culture ที่ค่าความเจือจาง (dilution rate) ของระบบเท่ากับ 0.06 h^{-1} และจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์โดยมีอัตราการผลิตลิปิดจำเพาะเท่ากับ 0.059 กรัมลิปิด/กรัมยีสต์/ชั่วโมง (Gill et al, 1977) ยีสต์ *C. curvatus* เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหมักแบบกะป้อน ระยะเวลาการหมัก 50 ชั่วโมง พบว่าให้ปริมาณเซลล์ 118 กรัม/ลิตร ปริมาณลิปิด 25% โดยน้ำหนัก อัตราการผลิตลิปิด 0.59 กรัมลิปิด/ลิตร/ชั่วโมง และกรดไขมันหลักที่พบประกอบด้วยกรดลิโนเลอิก (C18:2) กรดสเตียริก (C18:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) (Meesters et al, 1996) ยีสต์ *Rhodotorula glutinis* IIP-30 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหมักแบบกะป้อนภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจนให้ผลผลิตลิปิดสูงสุด 66% โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และ pH 4.0 (Johnson et al, 1992) เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Candida curvata* ในน้ำสกัดจากกล้วยด้วยการหมักแบบกะป้อนพบเซลล์มีอัตราการเจริญสูงและมีการสะสมลิปิด 30% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Vega et al, 1988)

ยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* ATCC 10788 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C/N ratio เท่ากับ 77 ให้ผลผลิตลิปิดสูงสุด ชนิดของกรดไขมันที่พบแปรตามค่าของ C/N ratio (Turcotte and Kosaric, 1989) ยีสต์ *R. toruloides* มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 76% ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร (Li et al, 2006)

รายงานการศึกษาการผลิตลิปิดของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula glutinis, Candida utilis, Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผงชูรสพบว่า *R. glutinis* มีการเจริญและสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์และน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์เมื่อผ่านกระบวนการ transesterification แล้วมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลได้ (Xue et al, 2006)

จุลินทรีย์ที่มีการผลิตและสะสมลิปิดภายในเซลล์มีจำนวนมาก ปริมาณลิปิดที่สะสมภายในเซลล์และคุณสมบัติของลิปิดขึ้นกับชนิดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะในการเพาะเลี้ยง รายงานการวิจัยพบว่ายีสต์มีอัตราการเจริญสูงและมีความสามารถในการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น *Yarrowia lipolytica, Cryptococcus* sp., *Rhodotolura* sp., (Muniglia et al, 2005; Tehlivets et al, 2006) และนอกจากนั้นน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์มีคุณสมบัติของ

triacylglycerol fraction คล้ายกับน้ำมันพืชโดยเฉพาะน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus curvatus (Candida curvata* D) (Moon et al, 1978)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus curvatus* ด้วยการหมักแบบกึ่งกะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 53 % ในเวลา 172 ชั่วโมง (Hassan et al, 1996) การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida* 107 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสด้วยระบบการหมักแบบต่อเนื่อง single-state continuous culture ที่ค่าความเจือจาง (dilution rate) ของระบบเท่ากับ 0.06 h^{-1} และจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์โดยมีอัตราการสะสมลิปิดจำเพาะ (specific rate of lipid formation) เท่ากับ 0.059 กรัม ลิปิด/กรัมยีสต์/ชั่วโมง (Gill et al, 1977)

เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Candida curvata* ในน้ำสกัดจากกล้วยด้วยระบบการหมักแบบกึ่งกะพบเซลล์มีเจริญสูงและมีการสะสมลิปิด 30% ของน้ำหนักแห้ง (Vega et al, 1988) รายงานการศึกษาการผลิตลิปิดของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula glutinis, Candida utilis, Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผงชูรส monosodium glutamate พบว่า *Rhodotorula glutinis* มีการเจริญและสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์และน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์เมื่อผ่านกระบวนการ transesterification แล้วมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลได้ (Xue et al, 2006)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 ในการหมักแบบกะป้อนเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเซลล์สะสมลิปิดสูงถึง 67.5% โดยน้ำหนักแห้ง และให้ผลผลิตลิปิด (lipid productivity) เท่ากับ 0.54 กรัมลิปิด/ลิตร/ชั่วโมง และน้ำมันที่สกัดได้ประกอบด้วยกรดไขมันหลักๆ คือ กรดปาลมิติก กรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดลิโนเลอิก ซึ่งใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ (Li et al, 2007)

ยีสต์ไอโซเลท *Candida viswanathii* OYS3 เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 90 กรัม/ลิตร ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน อุณหภูมิ 30°C ให้ปริมาณลิปิดที่ 4.10 กรัมลิปิด/ลิตรหรือ 52.7% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเลี้ยงแบบกึ่งกะให้ปริมาณเซลล์ 9.11 กรัม/ลิตร ปริมาณลิปิด 59.5% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และยีสต์ *C. viswanathii* OYS3 เจริญได้ดีในกลีเซอรอลและกากน้ำตาลโดยให้เซลล์ 7.8, 7.1 กรัม/ลิตร และปริมาณลิปิดร้อยละ 37.2 และ 39.4 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปิดที่สกัดได้พบว่าเป็นกรดไขมันชนิดสายยาวโดยมีกรดปาล์มิติก กรดสเตียริกและกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช (Leesing and Nontaso, 2011)

Huang และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตน้ำมันจากยีสต์ *Trichosporon fermentus* เมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยฟางข้าว (rice straw hydrolysate) พบว่ายีสต์ให้ปริมาณลิปิดสูง 41% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

การเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูง *Torulaspora maleeae* Y30 ที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดชัยภูมิ ด้วยการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าให้อัตราการผลิตลิปิด (volumetric lipid production rate) เท่ากับ 0.382g/L/d ปริมาณลิปิด 3.06g/L เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 90g/L และ 0.2 g/L $(NH_4)_2SO_4$ (Leesing and Karraphan, 2011)

การศึกษาการผลิตลิปิดโดยยีสต์ไขมันสูง *Cryptococcus curvatus* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนได้ปริมาณเซลล์ 69g/L และปริมาณลิปิด

48%โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยลิปิดที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดโอเลอิค กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก และกรดลิโนเลอิก (Thiru et al., 2011)

Xu et al (2012) ศึกษาการผลิตลิปิดในยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* โดยใช้กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะขั้นตอนเดียว (one-stage batch cultivation) ในถังหมักขนาด ลิตร พบว่าการใช้ 5 26.7 กลีเซอรอลดิบเซลล์เจริญได้ดีได้ปริมาณมวลเซลล์สูงg/L และได้ปริมาณลิปิด 70% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยกรดขัมนหลักที่พบคือกรดปาลมิติก (palmitic acid, C16:0), C18:0 (stearic acid), C18:1 (oleic acid) และ C18:2 (linoleic acid) ที่ 26%, 12%, 45% และ 11% ของกรดไขมันทั้งหมด (total fatty acid) ตามลำดับ

Galafassi et al (2012) ศึกษาการผลิตลิปิดโดยยีสต์ไขมันสูง *Rhodotorula graminis* เมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดที่ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษออก (undetoxified corn stover hydrolysate) พบว่าได้อัตราการผลิตลิปิด 0.21g/L/h และปริมาณลิปิด 34%โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนได้อัตราการผลิตลิปิด 0.15g/L/h และปริมาณลิปิด 54% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

Zhang et al. (2011) รายงานการผลิตลิปิดจากยีสต์ *Cryptococcus curvatus* O3 จากกลูโคส โดยศึกษาผลของปริมาณกลูโคสและไนโตรเจน เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะในระดับฟลาสก์เขย่าที่ 30C ได้ปริมาณเซลล์ 51.8kg/m3 และปริมาณลิปิด 651g/kg ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนในถังหมัก Stirred-tank fermentor ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 185 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์ 104.1kg/m3 ปริมาณลิปิด 827g/kg และอัตราการผลิตลิปิด 0.47kg/m3/h เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันด้วยเครื่อง GC พบว่าเป็นกรดไขมันชนิดสายยาว (long-chain fatty acids) ประกอบด้วยกรดปาล์มิติก (palmitic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) กรดโอเลอิค (oleic acid) และลิโนเลอิก (linoleic acid)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและน้ำตาลที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพด (corncob hydrolysate) ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะพบว่าเมื่อใช้กลูโคส 4% (w/w) เซลล์เจริญสูงสุด โดยมีปริมาณเซลล์ 9.4g/L ปริมาณลิปิด 6.0g/L หรือ 63.5% (w/w) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงแบบกะพบผลการยับยั้งการเจริญและการผลิตลิปิด (inhibitory effect) เมื่อกลูโคสเข้มข้น 6% และเมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนสามารถลดผลของ inhibitory effect ลงได้ โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร corncob hydrolysate ที่มีน้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้น 4% และเติมกลูโคส 2% ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงได้ปริมาณเซลล์ 10.8 g/L และปริมาณลิปิด 61.3% (w/w) ผลผลิตรวมของลิปิด (overall lipid production) เพิ่มขึ้นเป็น 1.08g/L/d ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนใน corncob hydrolysate ที่มีกลูโคสเริ่มต้น 4% และเติม corncob hydrolysate ที่มีกลูโคส 2% (Huang Chang et al., 2013)

บทที่ 3
วิธีการศึกษาวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

ฟลาสก์ขนาด 250, 500, 4000 มิลลิลิตร
หลอดทดลองขนาด 16x150 และ 20x150 มิลลิลิตร
ลูปเขี่ยเชื้อ และตะเกียงบุนเสน
ปิเปตขนาด 5, 10 มิลลิลิตร
ไมโครปิเปตขนาด 200-1000 µL
เครื่องสเปคโตรโฟโตรมิเตอร์ (Spectrophotometer)
เครื่องบ่มแบบ (Shaker)
เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer)
เครื่องชั่ง (Balance)
ตู้อบแห้ง (Hot air oven)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Lipid accumulation medium (LAM)
อาหาร YM medium

3.1.3 สารเคมี

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธี DNS (ภาคผนวก)
สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณลิปิดโดยวิธี Know and Rhee (ภาคผนวก)

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์พื้นถิ่นที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ คือ *Torulaspora maleeae* Y30

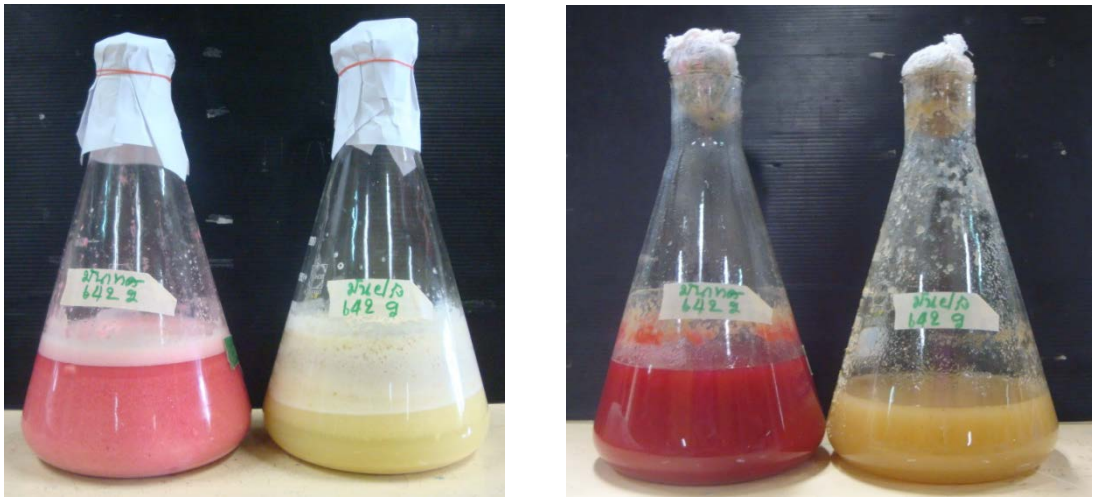
แหล่งคาร์บอน คือ มันเทศ (Sweet potato) จากตลาดเทศบาลนครขอนแก่น

3.3 การเตรียมน้ำตาลรีดิวส์จากมันเทศ

ศึกษาการเตรียมน้ำตาลจากหัวมันเทศ (Fresh sweet potato root) มาย่อยด้วยกรดอ่อน (dilute hydrochloric acid hydrolysis) ภายใต้สภาวะต่างๆ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธี DNS คัดเลือกสภาวะการย่อยที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงสุด

3.3.1 การเตรียมน้ำตาลรีดิวส์จากหัวมันเทศสด (sweet potato hydrolysate, SPH1)

ปอกเปลือกมันเทศและล้างน้ำให้สะอาด หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นชั่งมันเทศให้ได้ 15, 30, 45 กรัม นำมันเทศที่ชั่งไว้มาเติมกรด 1.5% HCl โดยมีอัตราส่วนของมันเทศ (กรัม) : กรด (มิลลิลิตร)= 1:5 ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่น อัตราส่วนของมันเทศ (กรัม): น้ำกลั่น(มิลลิลิตร) เท่ากับ 1:20 ผสมเข้าด้วยกัน ต้มมันเทศที่ย่อยด้วยกรดโดยการใช้ความร้อนภายใต้ความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนประมาณ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3.1) โดยเก็บไว้ในตู้เย็น ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.5 ทิ้งให้ตกตะกอน แล้วนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำมันเทศที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที วิเคราะห์ผลด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี DNS method น้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ (SPH1) นำไปเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์



A B

รูปที่ 3.1 การเตรียมน้ำตาลจากหัวมันเทศและมันฝรั่ง มันเทศ/มันฝรั่งบดก่อนการย่อย (A) ภายหลังการย่อย (B) ที่สภาวะต่างๆ และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศภายหลังจากแยกกากออกด้วยการปั่นเหวี่ยง (Hydrolysates)

3.3.2 การเตรียมน้ำตาลรีดิวส์จากผงมันเทศ (sweet potato power hydrolysate, SPH2)

นำมันเทศมาปอกเปลือกและล้างน้ำให้สะอาด หั่นมันเทศให้เป็นชิ้นบางๆ นำไปทำให้แห้งด้วยการตากแดดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และผึ่งลมให้มันเทศแห้ง แล้วนำไปอบ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นจนเป็นผงละเอียด จากนั้นชั่งมันเทศ 5 กรัม แล้วนำมาเติมกรด 1.5% HCl โดยมีอัตราส่วนของมันเทศ (g) : กรด (mL) เท่ากับ 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 ปรับปริมาตรเป็น 150mL โดยใช้น้ำกลั่น ต้มมันเทศที่ย่อยด้วยกรดโดยการใช้ความร้อนภายใต้ความดัน (autoclave) 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนประมาณ 24 ชั่วโมง โดยเก็บไว้ในตู้เย็น ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.5 ทิ้งให้ตกตะกอน แล้วนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำมันเทศที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที วิเคราะห์ผลด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี DNS method น้ำตาลที่ได้จากการย่อยผงมันเทศ (SPH2) นำไปเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์

3.4 การศึกษาปัจจัยต่อการเจริญและผลิตลิปิดของยีสต์ด้วยการหมักแบบกะ

3.4.1 ศึกษาระยะเวลาการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์

การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter/inoculum) โดยเตรียมอาหาร LAM ที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ (SPH1, SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 100mL ในฟลาสก์ขนาด 250mL เขี่ยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Torulaspora maleeae* Y30 ลงในอาหาร จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหาร LAM medium ปริมาตร 200mL ใน flask ขนาด 500mL โดยมีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณเชื้อตั้งต้น 10% โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มแบบเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 150 rpm เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 1 วัน เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลองดังนี้คือ การเจริญของยีสต์ด้วยการวัดน้ำหนักแห้งโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานค่าความขุ่นของเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณลิปิดด้วยวิธีวัดสี Colorimetric method และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีด้วยวิธี DNS method

3.4.2 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหาร LAM medium ปริมาตร 200mL ใน flask ขนาด 500mL ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน คือ Urea, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ และ yeast extract ปริมาณ 0.75g/L เติมเชื้อเชื้อตั้งต้น 10% โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มแบบเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 150 rpm เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 1 วัน เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลองดังนี้คือ การเจริญของยีสต์ด้วยการวัดน้ำหนักแห้งโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานค่าความขุ่นของเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณลิปิดด้วยวิธีวัดสี Colorimetric method และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีด้วยวิธี DNS method

3.4.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหาร LAM medium ปริมาตร 200mL ใน flask ขนาด 500mL ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากข้อ 3.4.2 ที่ค่าต่างๆ คือ 0.75, 1.0, 1.25, 1.5g/L เติมเชื้อเชื้อตั้งต้น 10% โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มแบบเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 150 rpm เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 1 วัน เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลองดังนี้คือ การเจริญของยีสต์ด้วยการวัดน้ำหนักแห้งโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานค่าความขุ่นของเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณลิปิดด้วยวิธีวัดสี Colorimetric method และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีด้วยวิธี DNS method

3.5 ขยายขนาดการผลิตลิปิดจากยีสต์ไขมันสูง

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหาร LAM medium ที่มีน้ำตาลที่ได้จากมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ขนาด 4000mL ปริมาตรอาหาร 2000mL บ่มโดยมีการกวนแบบสม่ำเสมอบนเครื่องกวนผสมสาร (stirrer plate) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ยีสต์ด้วยการปั่นเหวี่ยงและนำมาอบแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dryer) เพื่อนำเซลล์แห้งไปศึกษาการผลิตไบโอดีเซล

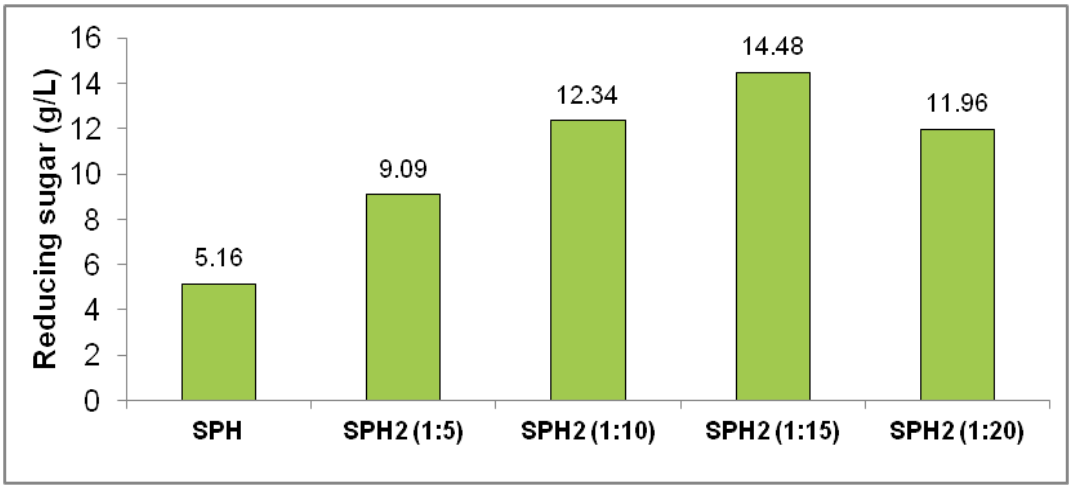
3.6 ศึกษาเบื้องต้นการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันยีสต์

การศึกษาโดยนำเซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้จากข้อ 3.5 มาผลิตไบโอดีเซลในรูป FAMEs โดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นแบบโดยตรง (direct transesterification) โดยศึกษาตามวิธีการของ Bradley and Robert (2011) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างเซลล์แห้ง 1.0g ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 50mL เติมเมทานอล 2.0mL และตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น คือ H_2SO_4 ร้อยละ 1.8 (v/v) ของจำนวนเมทานอลที่ใช้ ให้ความร้อนด้วยการนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 80°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม เอทานอลต่อคลอโรฟอร์ม เท่ากับ)1:2) และน้ำกลั่น 30mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบ/ วินาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนล่างที่เป็นชั้นของ fatty acid methyl esters (FAMEs) และไตรกลีเซอไรด์ที่ละลายอยู่ในคลอโรฟอร์มมาแยกตัวทำละลายหรือคลอโรฟอร์มออกด้วยวิธีการระเหย (evaporation) ให้เหลือแต่ส่วนของไบโอดีเซล (FAMEs) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณค่าของกรด (acid value) และปริมาณร้อยละของไบโอดีเซลโดยน้ำหนักแห้งยีสต์ที่ใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การเตรียมน้ำตาลรีดิวส์จากมันเทศ

การศึกษาโดยการย่อยมันเทศสด (SPH1) และมันเทศผงแห้ง (SPH2) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) ด้วยอัตราส่วนต่างกันโดยใช้ความร้อนชื้นภายใต้ความดัน (autoclave) ที่ 121°C เป็นเวลา 20 นาที ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.1 จากการศึกษาพบว่าการย่อยมันเทศผงด้วยอัตราส่วนของตัวอย่างมันเทศผงแห้ง (g): กรด (ml) = 1:15 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 14.48 g/L



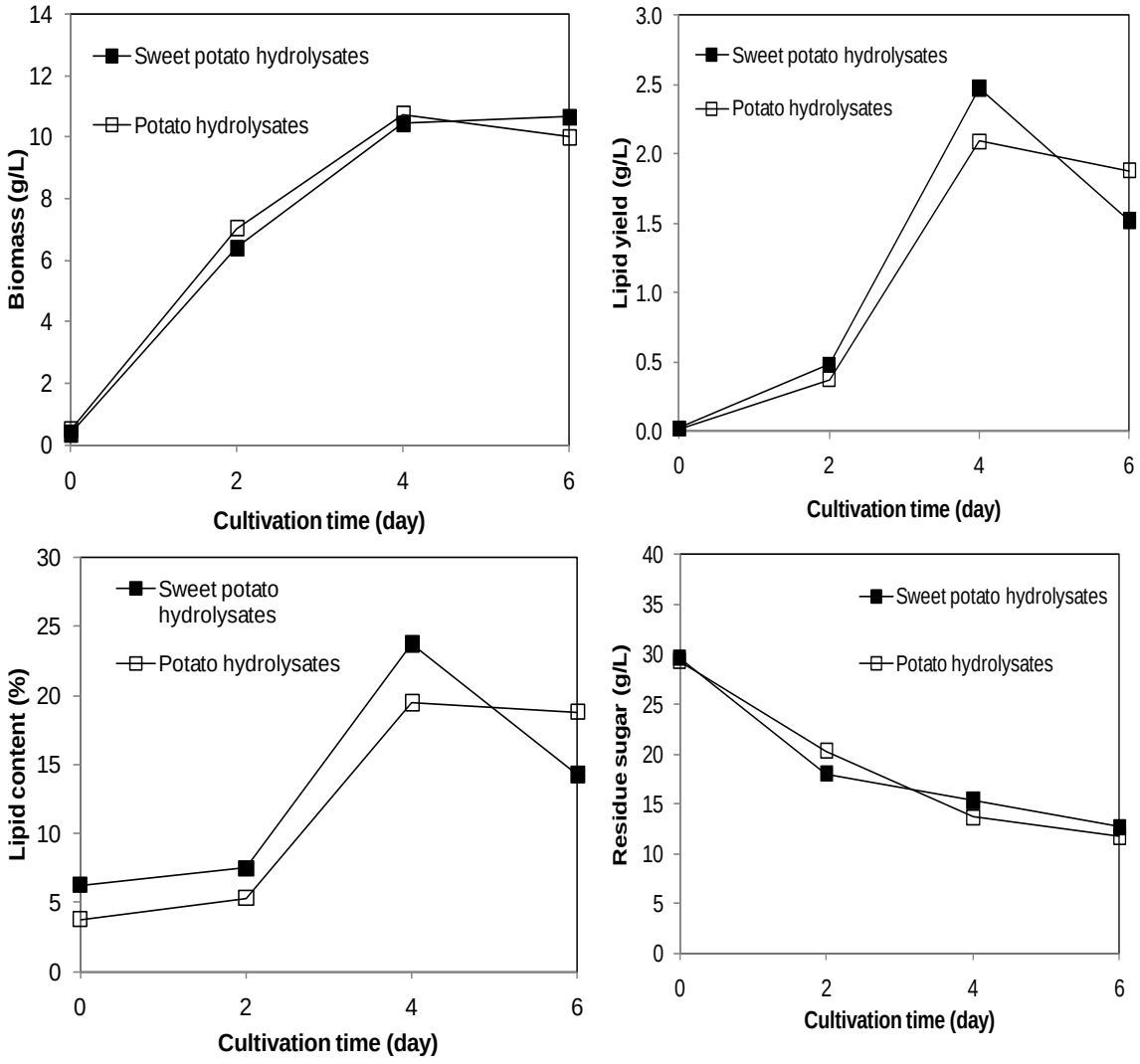
รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugar) ที่ได้จากการย่อยมันเทศด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) ภายใต้ความร้อนชื้นภายใต้ความดัน (autoclave) ที่ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

4.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ด้วยการหมักแบบกะ

4.2.1 การศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

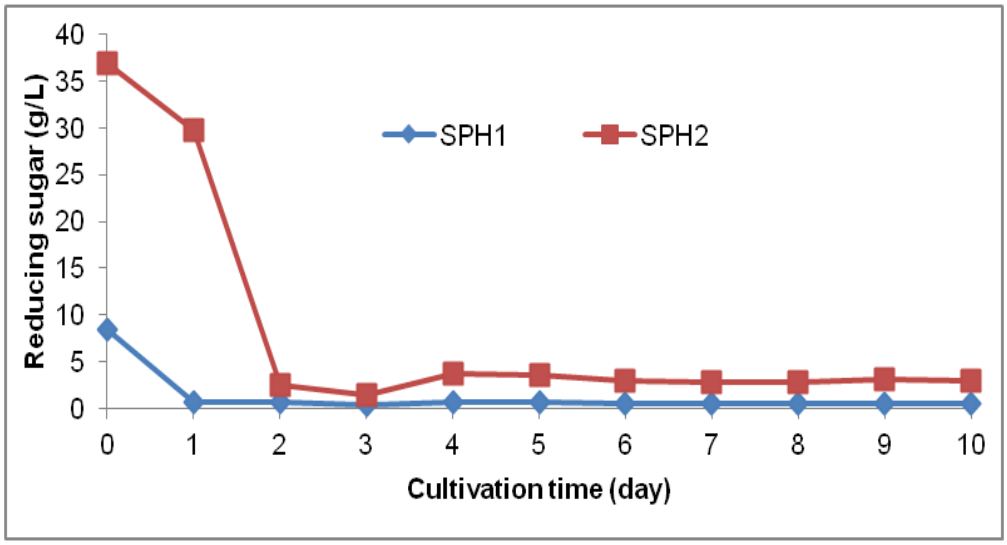
การศึกษาเบื้องต้นเพื่อศึกษาระยะเวลาการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูง *Torulaspora maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM (lipid accumulation medium) pH 5.5 เมื่อใช้น้ำตาลจากหัวมันเทศสด (sweet potato hydrolysate) เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันฝรั่งสด (potato hydrolysate) ในฟลาสก์ขนาด 1000mL ปริมาตรอาหาร 500mL บ่มแบบเขย่าที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 6 วัน ผลการวิจัยดังรูปที่ 4.2 จากรูปจะพบว่ายีสต์ *T. maleeae* Y30 สามารถเจริญได้ดีทั้งใน sweet potato hydrolysate และ potato hydrolysate โดยผลการศึกษาพบว่ายีสต์เข้าสู่การเจริญในระย log phase ตั้งแต่วันที่ 1 และเจริญได้สูงสุดในวันที่ 4

ของการเพาะเลี้ยงและการเจริญค่อนข้างคงที่หรือเริ่มเข้าสู่ stationary phae หลังวันที่ 4 และเริ่มลดลงในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการผลิตลิปิดเป็นไปตามเจริญของเซลล์โดยสะสมลิปิดสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงและลดลงในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี sweet potato hydrolysate และ potato hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี sweet potato hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอนยีสต์มีการสะสมลิปิดได้สูงกว่าในอาหารที่มี potato hydrolysate อย่างไรก็ดีจะเห็นว่าการเจริญของยีสต์ในอาหารทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกันมากนัก

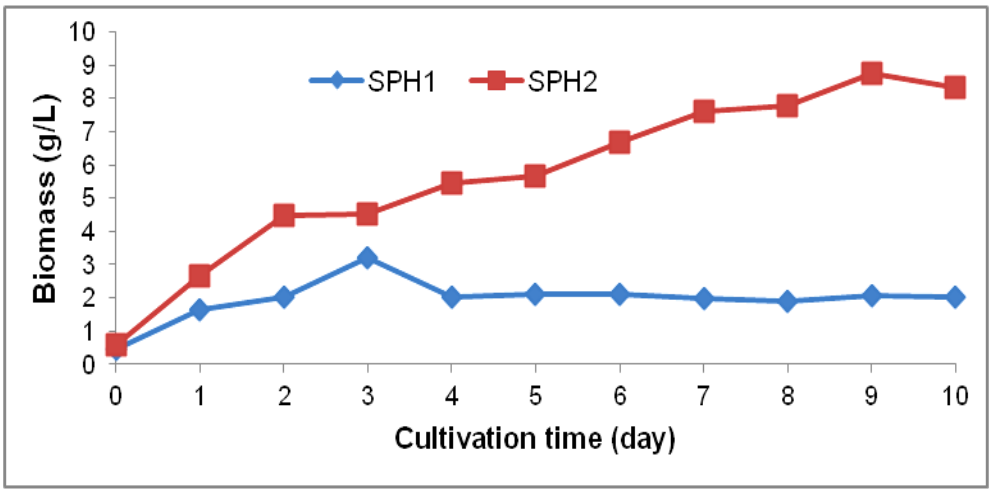


รูปที่ 4.2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (biomass, g/L), ปริมาณลิปิด (lipid yield, g/L) และน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar, g/L) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ (sweet potato hydrolysate) และ potato hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอน

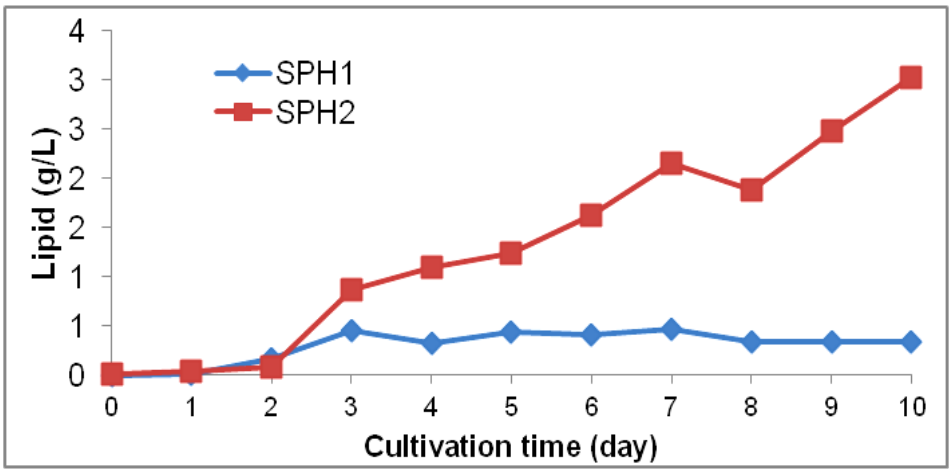
เมื่อศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM ปริมาตร 200mL ในฟลาสก์ขนาด 500mL บ่มที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.3-4.8 และตารางที่ 4.1



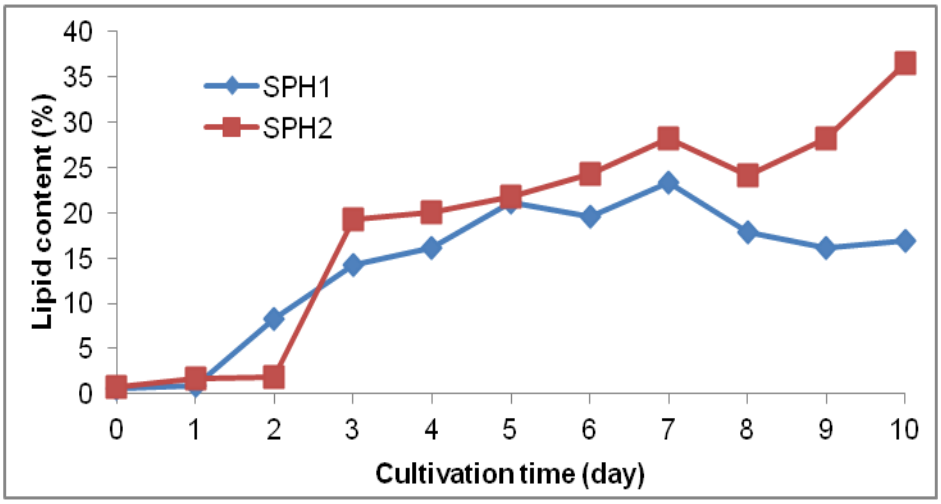
รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



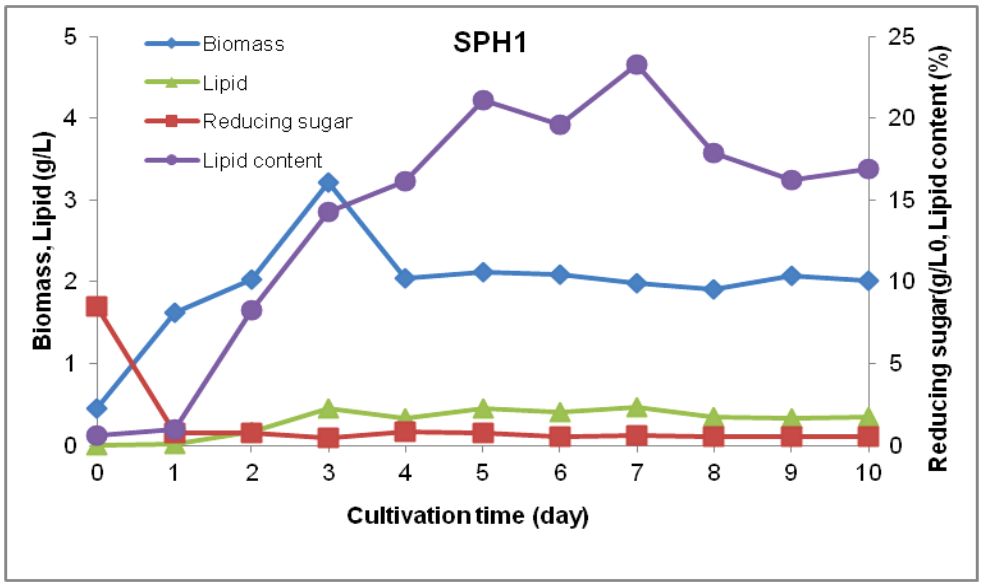
รูปที่ 4.4 ปริมาณเซลล์ (biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



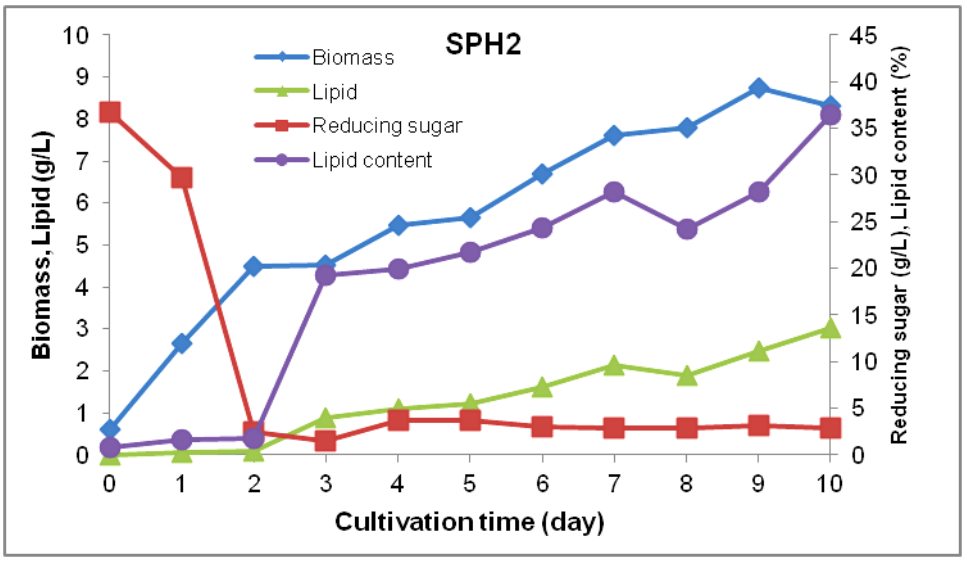
รูปที่ 4.5 ปริมาณลิปิด (Lipid) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



รูปที่ 4.6 ปริมาณลิปิด Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



รูปที่ 4.7 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน



รูปที่ 4.8 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (biomass) ปริมาณการใช้น้ำตาล (consumed sugar) ปริมาณลิปิด (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 *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) และน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

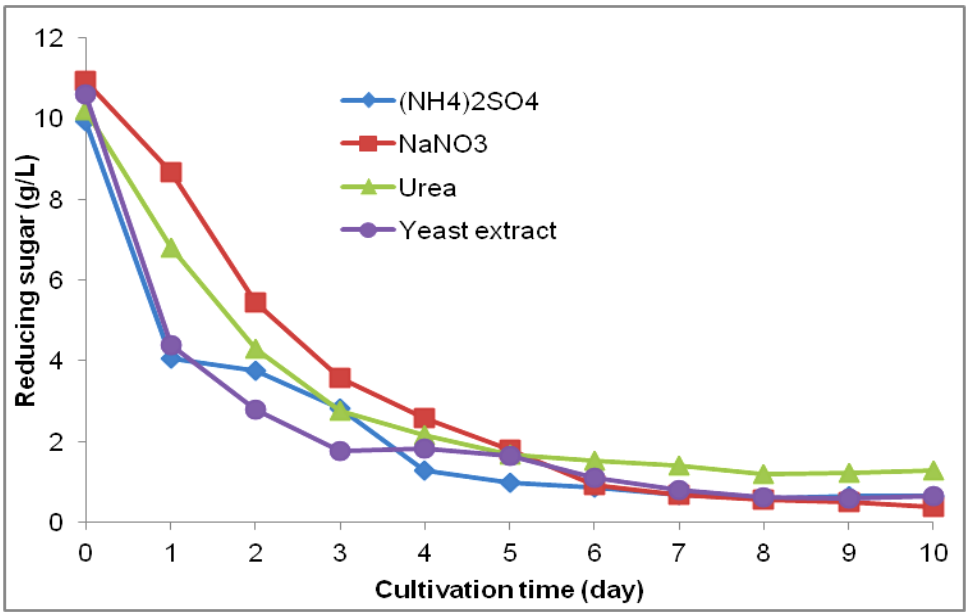
	Consumed sugar (g/L)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%)	Specific growth rate (/d)	$Y_{X/S}$	Q_P (g/L/d)	Q_X (g/L/d)
SPH1	7.87	1.99	0.462	23.28	0.098	0.252	0.058	0.248
SPH2	23.89	7.47	2.152	28.22	0.287	0.313	0.269	0.934

จากการศึกษาพบว่ายีสต์ *T. maleeae* Y30 เมื่อเจริญในอาหารที่มี SPH1 เป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ในวันที่ 1 และเข้าสู่ช่วงท้ายการเจริญ (late log phase) หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase ในวันที่ 3 การผลิตและสะสมลิปิดของเซลล์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญ ส่วนการเจริญในอาหารที่มี SPH2 เป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ในวันที่ 1 และเข้าสู่ช่วงท้ายการเจริญ (late log phase) หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase ในวันที่ 8-9 ของการเพาะเลี้ยง การผลิตและสะสมลิปิดของเซลล์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญ ผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Li et al (2007) ที่เพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus albidus* ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน พบว่าช่วงท้ายของการเจริญยีสต์จะมีปริมาณลิปิดสูงที่สุดและให้น้ำหนักเซลล์มากที่สุด

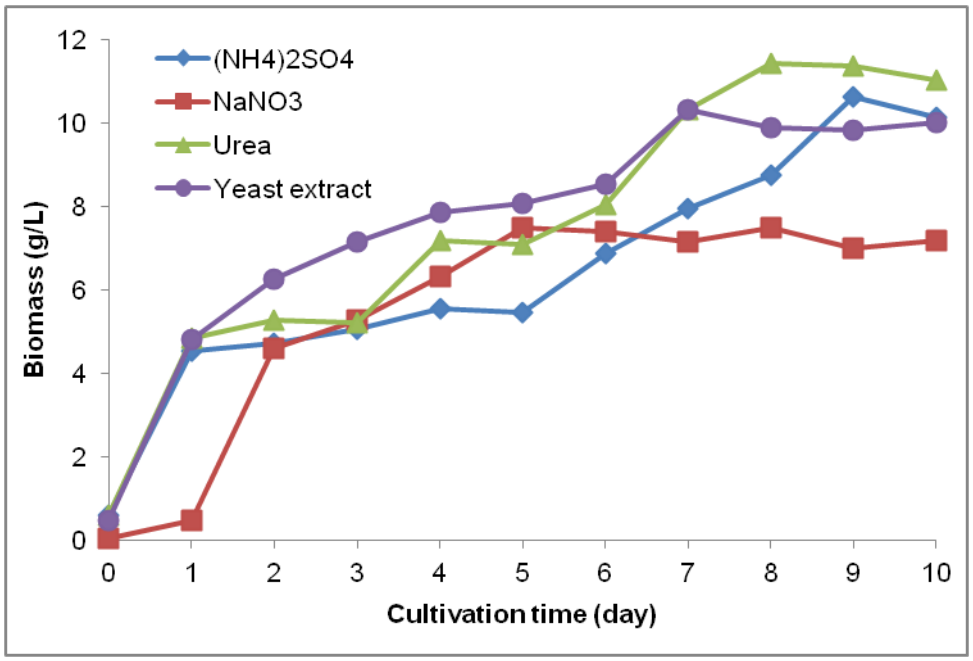
จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้น้ำตาลจากมันเทศผง (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอนเซลล์ให้ปริมาณลิปิดสูงกว่าการใช้น้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) โดยให้ปริมาณลิปิด 2.152g/L หรือ 28%โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) และปริมาณลิปิดที่ 0.462g/L หรือ 23.28%DCW สำหรับการใช้ SPH1 เมื่อเปรียบเทียบในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลที่ได้จาก SPH1 มีปริมาณต่ำสาเหตุจากมันเมศสดยังคงมีน้ำเป็นองค์ประกอบทำให้เมื่อนำมาย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวส์จึงทำให้ได้น้ำตาลรีดิวส์ที่ค่อนข้างเจือจางเมื่อเทียบกับผงมันเทศ (SPH2) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตลิปิด (Q_P) และอัตราการผลิตลิปิด (Q_X) พบว่า SPH2 ให้ Q_P และ Q_X ที่ 0.269g/L/d และ 0.934g/L/d ตามลำดับซึ่งสูงกว่าการใช้ SPH1 ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงคัดเลือกมันเทศผง (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงและผลิตลิปิดจากยีสต์ *T. maleeae* Y30

4.2.3 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน

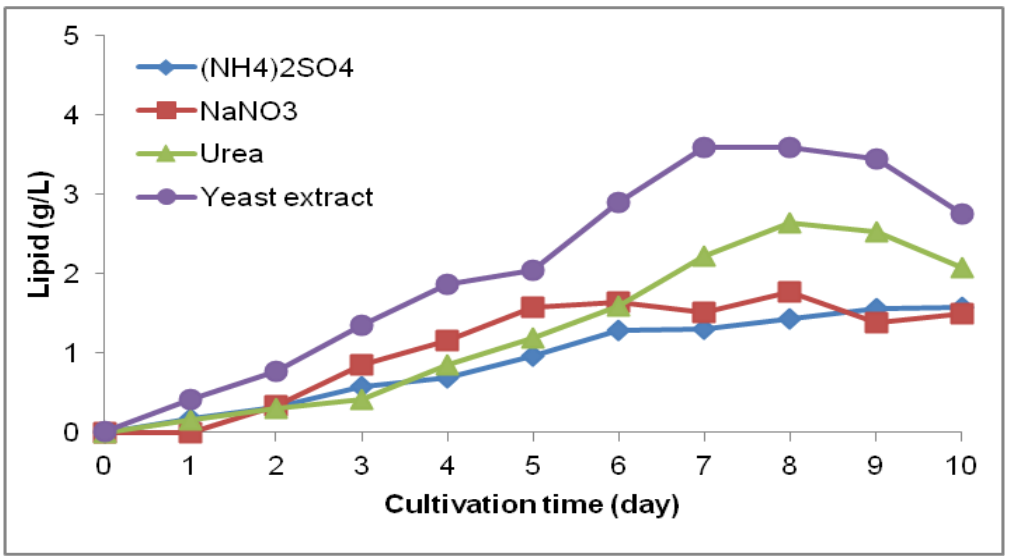
การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ปริมาตร 200mL ในฟลาสก์ขนาด 500mL โดยมีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน คือ Urea, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ และ yeast extract ปริมาณ 0.75 กรัม/ลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.9-4.17 และตารางที่ 4.2



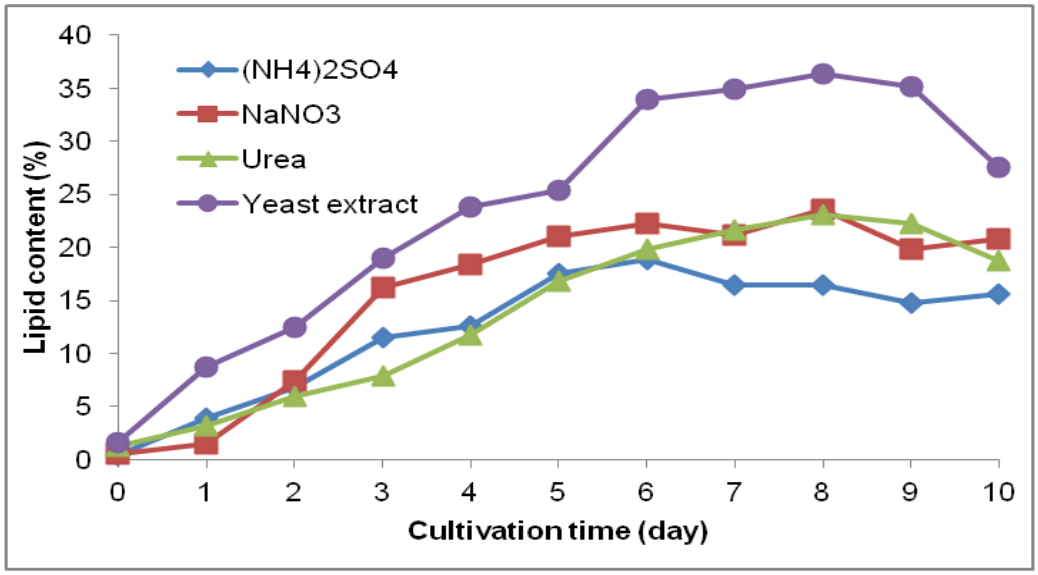
รูปที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, Urea และ yeast extract ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



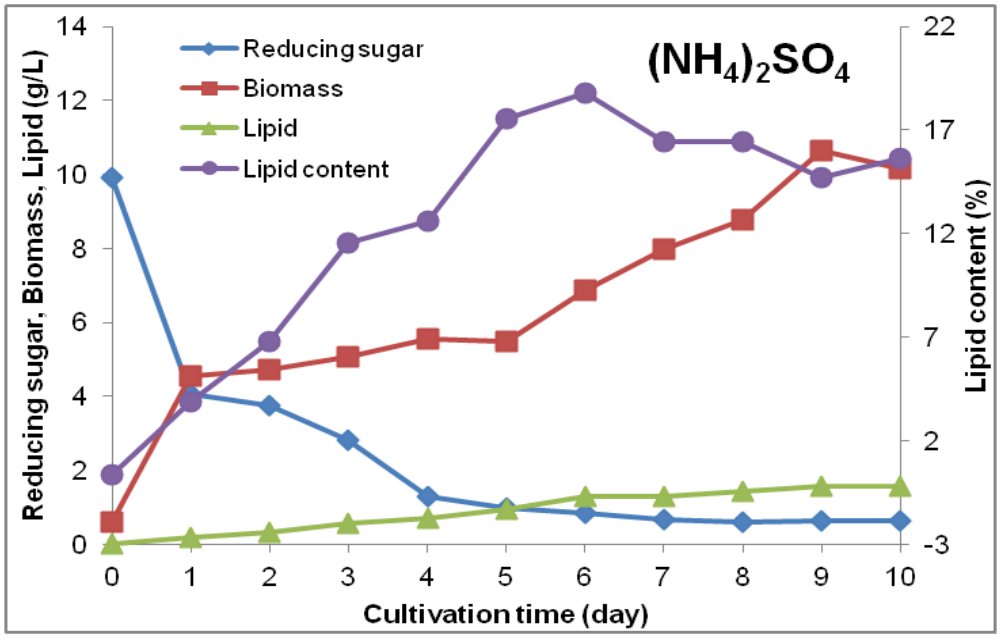
รูปที่ 4.10 ปริมาณเซลล์ (biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, Urea และ yeast extract ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



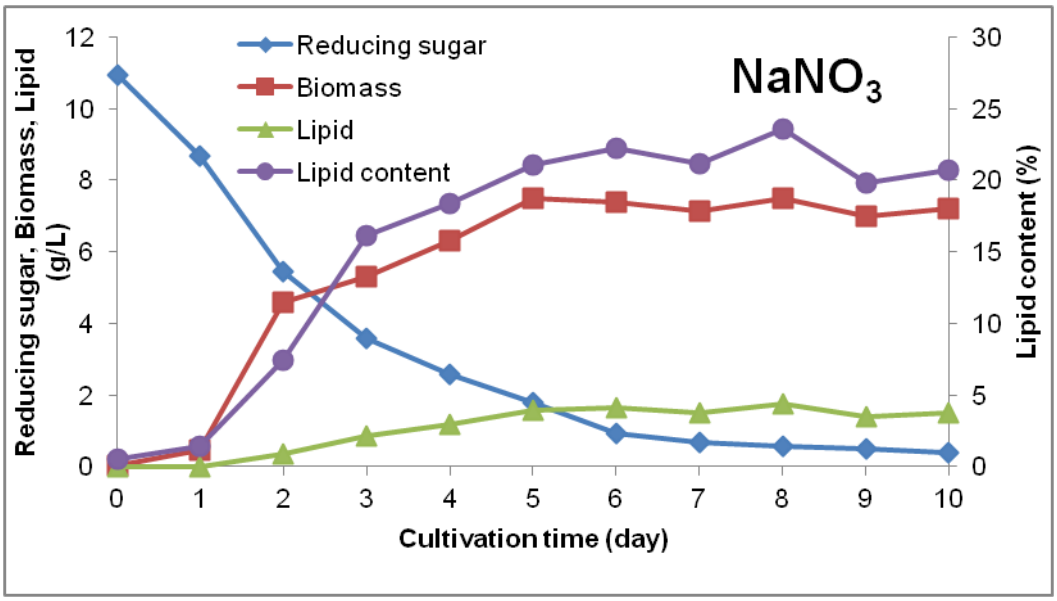
รูปที่ 4.11 ปริมาณลิปิด (Lipid) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, Urea และ yeast extract ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



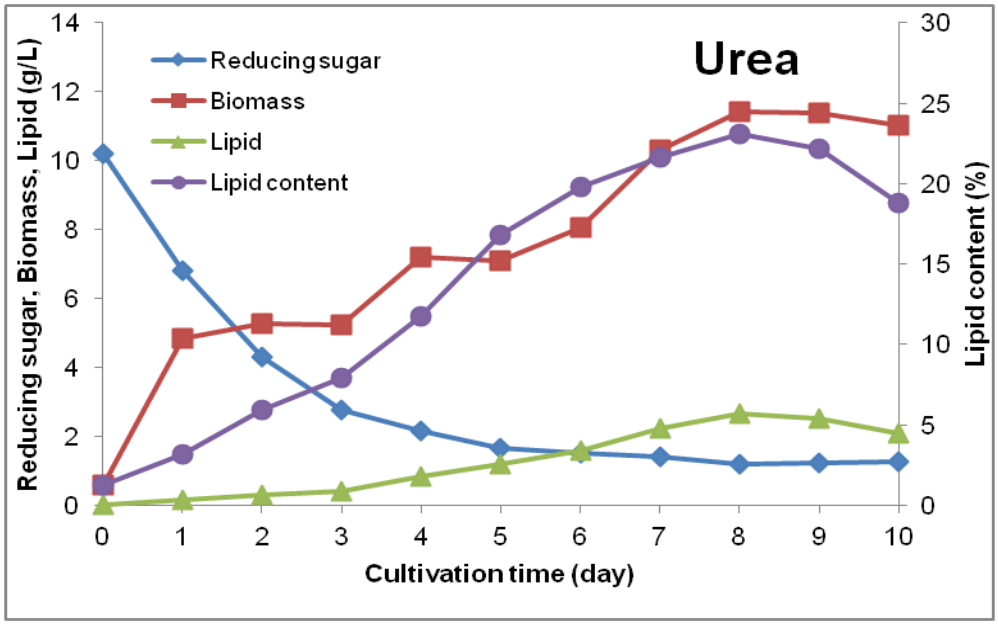
รูปที่ 4.12 ปริมาณลิปิด (Lipid content) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, Urea และ yeast extract ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



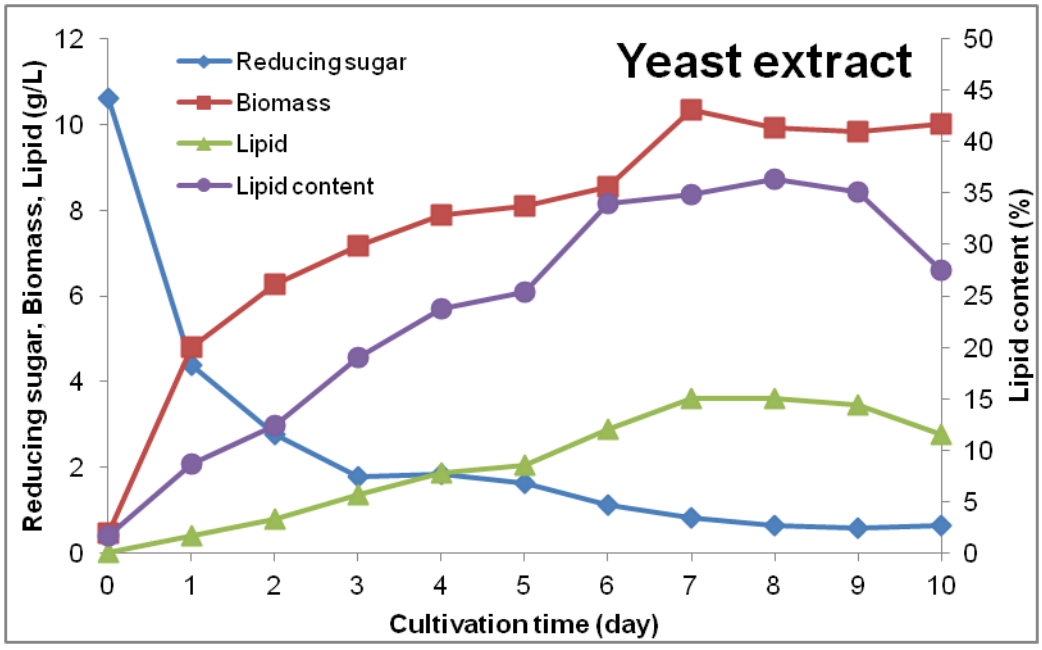
รูปที่ 4.13 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน



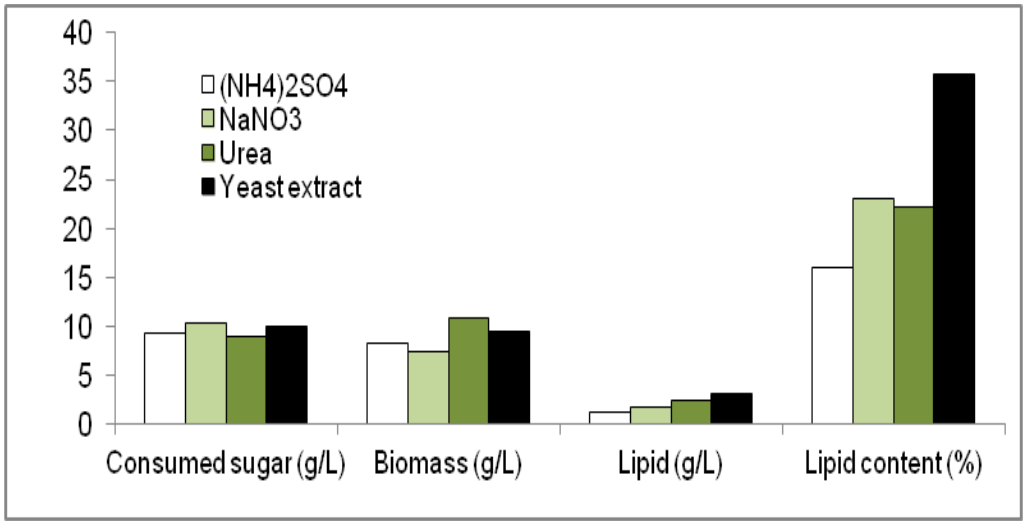
รูปที่ 4.14 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน



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



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



รูปที่ 4.17 เปรียบเทียบปริมาณการใช้น้ำตาล (Consumed sugar), ปริมาณเซลล์ (biomass), ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ในแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, Urea และ yeast extract ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

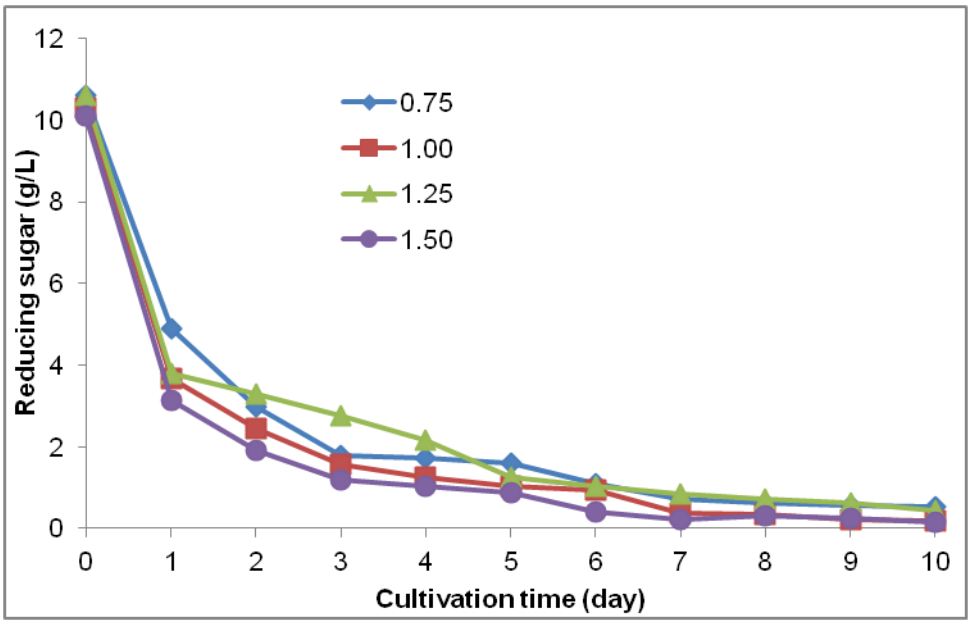
ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (biomass), ปริมาณการใช้น้ำตาล (consumed sugar) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ปริมาณผลได้ของเซลล์ (cell yield, $Y_{X/S}$) อัตราการผลิตลิปิด (Volumetric lipid production rate, Q_P) อัตราการผลิตเซลล์ (volumetric biomass production rate, Q_X) และผลได้ของลิปิด (Lipid yield, $Y_{P/X}$) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ในแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

	Consumed sugar (g/L)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%)	Specific growth rate (/d)	$Y_{X/S}$	Q_P (g/L/d)	Q_X (g/L/d)	$Y_{P/X}$
$(NH_4)_2SO_4$	9.32	8.18	1.26	16.05	0.263	0.878	0.158	1.022	0.155
$NaNO_3$	10.38	7.47	1.77	23.06	0.251	0.720	0.221	0.934	0.236
Urea	8.99	10.85	2.49	22.22	0.298	1.207	0.311	1.356	0.230
Yeast extract	9.98	9.43	3.18	35.66	0.281	0.945	0.398	1.179	0.337

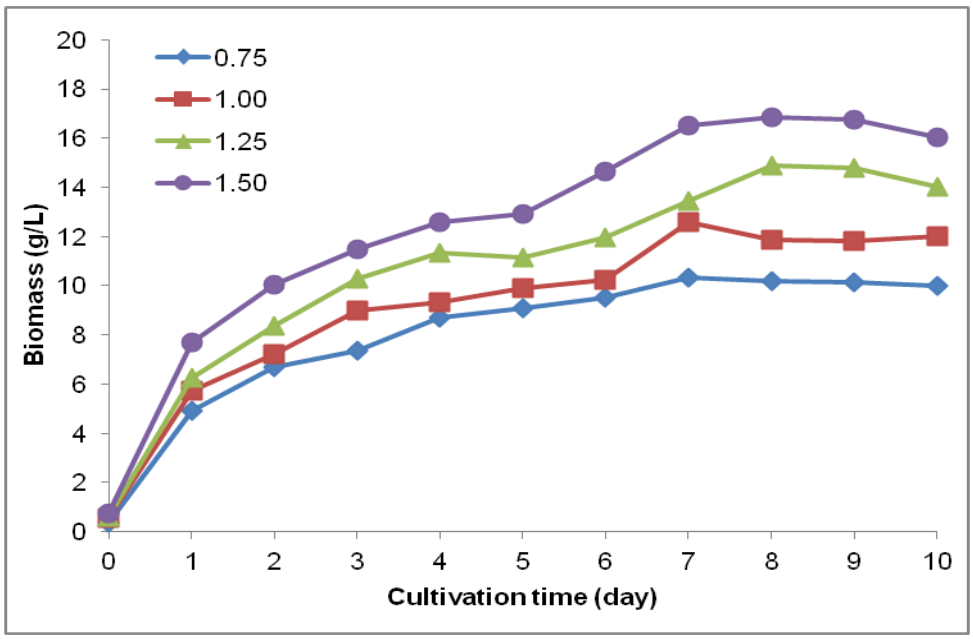
จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ yeast extract และยูเรีย (urea) ซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) จะส่งเสริมการเจริญของยีสต์ *T. maleeae* Y30 ได้ดีกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen) คือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ โดยมีอัตราการผลิตเซลล์ (Q_X) สูงสุด 1.356g/L/d, 1.179g/L/d หรือมีผลได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$) ที่ 1.207 และ 0.945 เมื่อใช้ urea และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิปิดพบว่าการใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.18g/L หรือ 35.66%DCW และอัตราการผลิตลิปิด (Q_P) สูงสุดที่ 0.398g/L/d ดังนั้นจึงเลือกใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาขั้นต่อไป

4.2.4 การศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

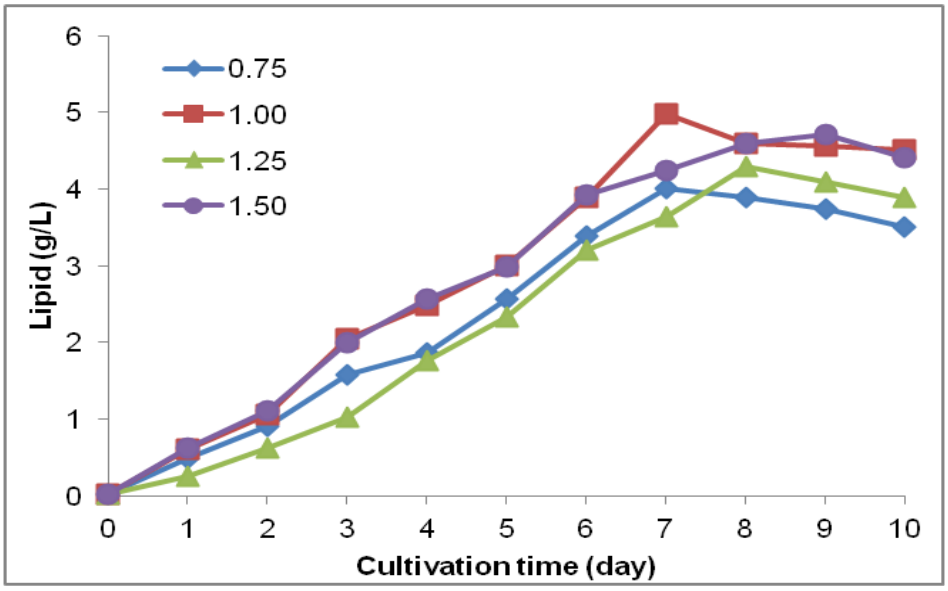
การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ปริมาตร 200mL ในฟลาสก์ขนาด 500mL โดยมีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันปริมาณของ yeast extract ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.18-4.26 และตารางที่ 4.3



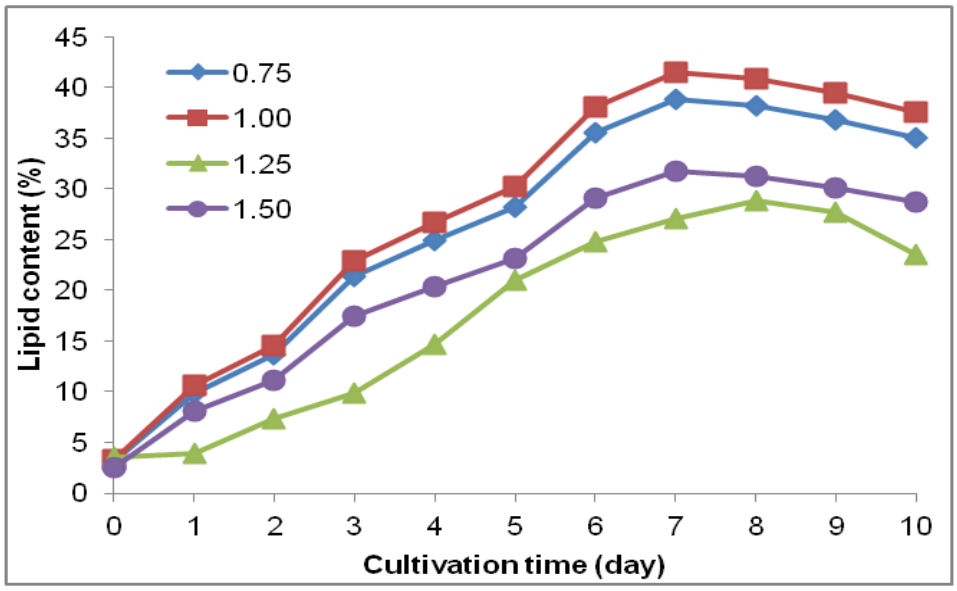
รูปที่ 4.18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมี yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



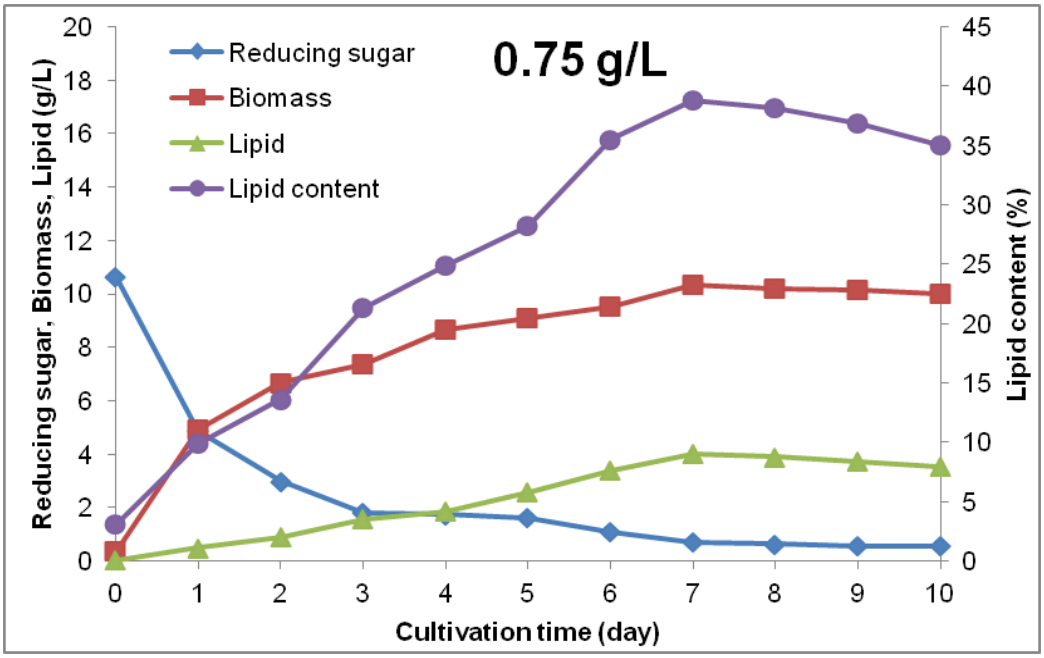
รูปที่ 4.19 ปริมาณเซลล์ (biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมี yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



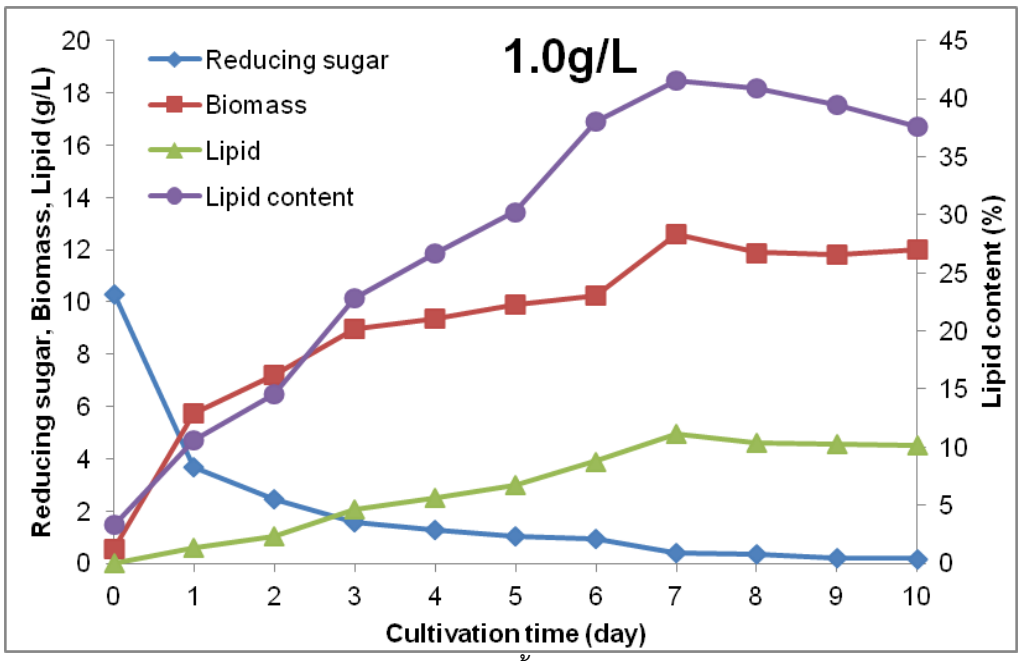
รูปที่ 4.20 ปริมาณลิปิด (lipid) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมี yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



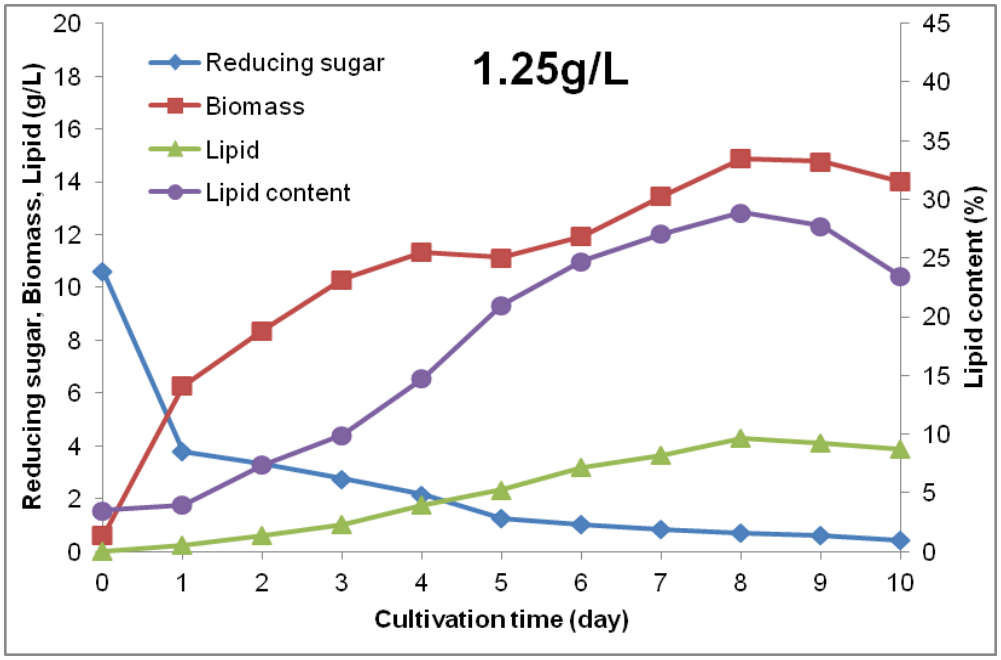
รูปที่ 4.21 ปริมาณลิปิด (lipid content) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมี yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน



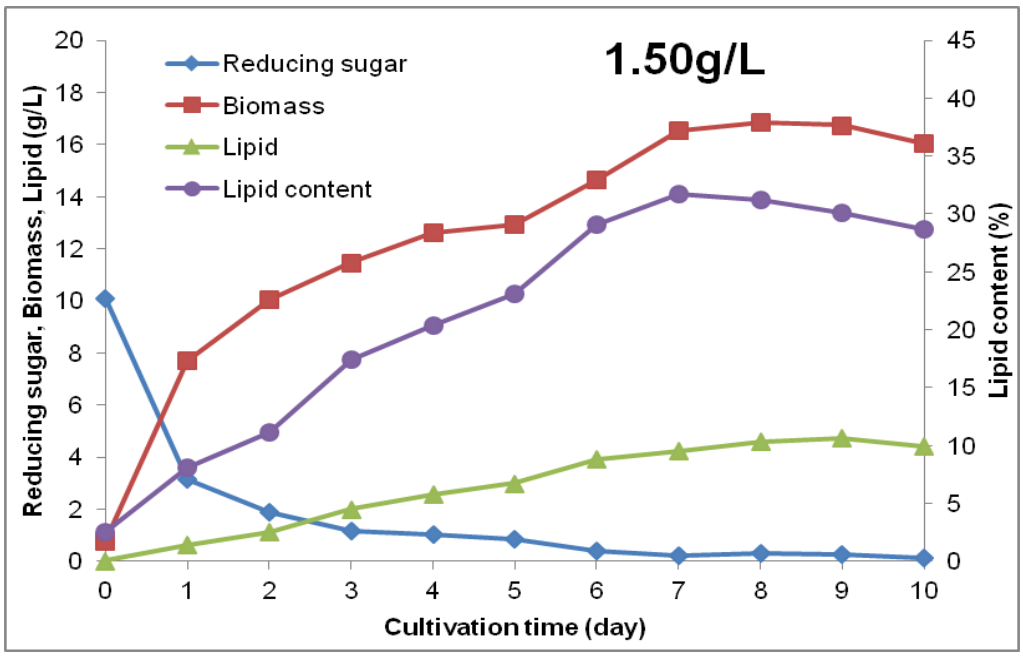
รูปที่ 4.22 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 0.75 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน



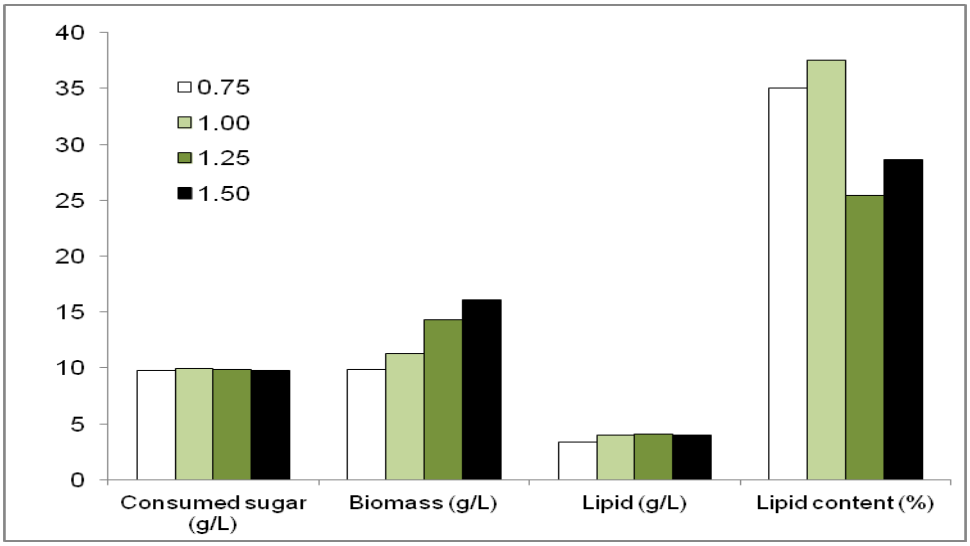
รูปที่ 4.23 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 1.0g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน



รูปที่ 4.24 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 1.25g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน



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



รูปที่ 4.26 เปรียบเทียบปริมาณการใช้น้ำตาล (Consumed sugar) ปริมาณเซลล์ (biomass) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน ในแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, Urea และ yeast extract ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ (biomass) ปริมาณการใช้น้ำตาล (consumed sugar) ปริมาณลิปิด (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, $Y_{P/X}$) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *T.maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มีน้ำตาลจากผงมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนและ yeast extract ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

	Consumed sugar (g/L)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%)	Specific growth rate (/d)	$Y_{X/S}$	Q_P (g/L/d)	Q_X (g/L/d)	$Y_{P/X}$
0.75	9.79	9.82	3.40	35.05	0.286	1.003	0.425	1.227	0.347
1.00	9.94	11.32	3.98	37.55	0.303	1.139	0.498	1.415	0.352
1.25	9.89	14.26	4.05	25.39	0.332	1.443	0.506	1.783	0.284
1.50	9.79	16.09	3.97	28.68	0.347	1.644	0.497	2.012	0.247

จากผลการทดลองและจากตารางที่ 4.3 พบว่าปริมาณการใช้น้ำตาลของการเพาะเลี้ยงทุกสภาวะไม่แตกต่างกันมากนัก การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 0.75g/L ให้ปริมาณเซลล์ต่ำสุด 9.82g/L ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 1.50g/L ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 16.07g/L ปริมาณลิปิดต่อปริมาตรไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 1.0, 1.25, 1.50g/L โดยให้ปริมาณลิปิด 3.98, 4.05, 3.97g/L แต่เมื่อเทียบเป็นปริมาณลิปิดต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (lipid content, %) พบว่าเมื่อปริมาณไนโตรเจนต่ำ (0.75, 1.0g/L yeast extract) เซลล์ให้ปริมาณลิปิดสูงกว่าในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนสูง (1.25, 1.50g/L yeast extract) โดยการสังเคราะห์ลิปิดของจุลินทรีย์จะเกิดได้ดีเมื่อมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในสภาวะที่มีคาร์บอนมากเกินพอและจำกัดปริมาณไนโตรเจน ซึ่งจะไปส่งเสริมการสร้าง acetyl-CoA เมื่อปริมาณไนโตรเจนจำกัดเซลล์จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ AMP deaminase เพิ่มขึ้นเป็น 5 เท่าของการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีการจำกัดไนโตรเจน การเพิ่มกิจกรรมของ AMP deaminase จะลดการสะสมของ AMP ภายในเซลล์และในไมโตรคอนเดรีย การลดลงของ AMP ในไมโตรคอนเดรียจะไประงับหรือหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ isocitatre dehydrogenase เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นกับปริมาณของ AMP ผลที่ได้คือ isocitatre จะไม่ถูกเปลี่ยนแต่จะสะสมภายในไมโตรคอนเดรียในรูปของ citrate จากนั้น citrate จะถูกส่งไปสู่ไซโตรพลาสซึมและถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate ด้วยเอนไซม์ ATP:citrate lyase (ACL) และ acetyl-CoA จะถูกนำไปสังเคราะห์กรดไขมัน (Ratledge, 2004)

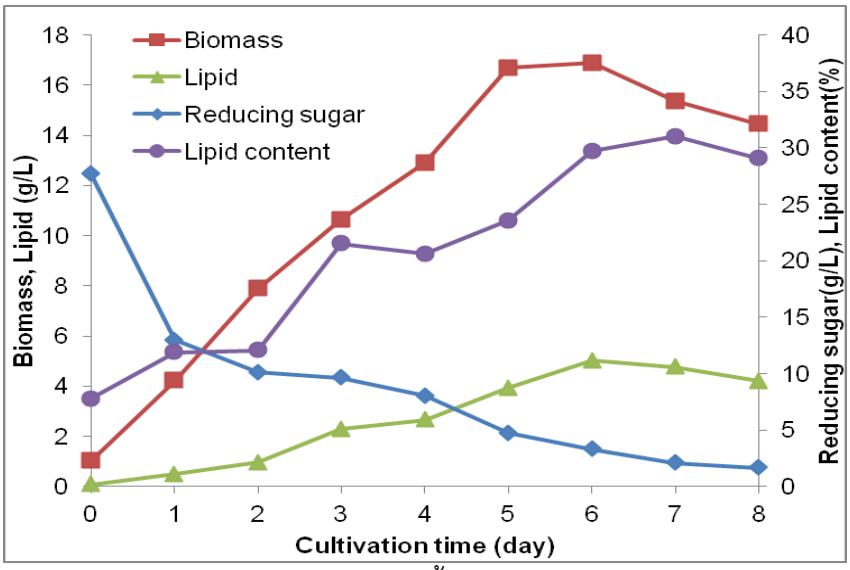
โดยเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนสูงซึ่งทำให้อัตราส่วนของปริมาณ C/N ratio ต่ำเชื้อจะมีการเจริญหรือเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าการสร้างลิปิด โดยสังเกตุได้จากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) โดยพบอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของยีสต์ *T. maleeae* Y30 เท่ากับ 0.347 และ 0.332 (/d) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 1.5 และ 1.25g/L ตามลำดับ ส่วนในอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำอัตราการเจริญจำเพาะต่ำที่ 0.286 และ 0.303 (/d) ในอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่มี yeast extract 0.75, 1.0g/L ตามลำดับ แต่ในช่วงของการผลิตลิปิดเซลล์ต้องการคาร์บอนสูงเพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นลิปิดจึงต้องการอัตราส่วนของปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง การกดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนหรือที่ค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงนั้นเซลล์จะลดการใช้ NADPH ในการสร้างโปรตีนหรือการเจริญและเมื่อมีการสะสม NADPH มากขึ้นจะทำให้เซลล์เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ลิปิดสูงขึ้น (Turcotte and Kosaric, 1989; Hassan et al, 1996; Yamane et al., 1997) Papanikolaou et al. (2004) ซึ่งสรุปว่าค่า C/N ratio ต่ำหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนสูงและปริมาณกลูโคสต่ำนั้นเหมาะต่อการเจริญหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ในช่วงของการผลิตลิปิดนั้นเซลล์ต้องการคาร์บอนสูงเพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นลิปิดจึงต้องการกลูโคสสูง

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตเซลล์ (volumetric biomass production rate, Q_X) ของยีสต์ *T. maleeae* Y30 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 1.0, 1.25, 1.50g/L ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันมากนักที่ 0.498, 0.506, 0.497 g/L/d ตามลำดับ ส่วนอัตราการผลิตเซลล์พบว่าเมื่อไนโตรเจนสูง yeast extract 1.25, 1.50g/L ให้ปริมาณสูงที่ 1.783 และ 2.012g/L/d ส่วนที่ปริมาณ yeast extract 0.75, 1.0g/L ให้อัตราการผลิตเซลล์ที่ 1.227 และ 1.415g/L/d ตามลำดับ โดยจากผลการศึกษานี้เมื่อพิจารณาที่ค่าอัตราการผลิตเซลล์และลิปิดไปพร้อมกันจึงคัดเลือกปริมาณ yeast extract ที่ 1.25-1.5g/L เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

4.3 ขยายขนาดการผลิตลิปิดจากยีสต์ไขมันสูง

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหาร LAM medium ที่มี SPH2 เป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ 4000mL ปริมาตรอาหาร 2000mL บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน พบว่าได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 16.89g/L ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณลิปิดสูงสุด 5.02g/L หรือ 29.73%DCW ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.27



รูปที่ 4.27 การเจริญของเซลล์ (biomass) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ปริมาณลิปิด และ Lipid content ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ที่มี

น้ำตาลจากผงมันเทศ (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract 1.50g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 30°C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน

4.4 ศึกษาเบื้องต้นการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันยีสต์

การศึกษาโดยนำเซลล์ยีสต์ *T. maleeae* Y30 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ผลิตได้จากข้อ 4.3 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000rpm 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและนำไปทำแห้งแบบแช่แข็งด้วยเครื่อง freeze dryer (รูปที่ 4.28) จากนั้นศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในรูป fatty acid methyl esters (FAMEs) แบบโดยตรงจากเซลล์ยีสต์แห้ง (direct transesterification) ตามวิธีการที่ดัดแปลงของ Bradley and Robert (2011) เมื่อวิเคราะห์คุณภาพโดยหาปริมาณค่าของกรด (acid value) โดยไตเตรทสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลาย 0.1 N KOH พบว่ามีปริมาณค่าของกรดเท่ากับ 3.29 mgKOH/g ของ FAME และมีปริมาณไบโอดีเซลเท่ากับ 60.1% ของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งจะเห็นว่าค่าของกรด (Acid value) สูงกว่าค่าตามมาตรฐานไบโอดีเซล (ASTM D664) เมื่อเปรียบเทียบกับไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชและมาตรฐานไบโอดีเซลตามประกาศของกรมธุรกิจพลังงาน พ.ศ. 2550 นั้นค่าของกรด (Acid value) ต้องต่ำกว่า 0.5mgKOH/g (ASTM D664) โดยค่าของกรดนี้จะอ้างอิงถึงปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid, FFA) ที่พบในน้ำมันหรือลิปิดที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นในการศึกษาต่อไปอาจทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) เพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิสระลงโดยถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอไรด์จากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อผลิตไบโอดีเซลต่อไป

รูปที่ 4.28 แสดงเซลล์แห้งของยีสต์ *T. maleeae* Y30 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง

รูปที่ 4.29A แสดงการแยกชั้นของสารละลาย โดยชั้นบนเป็นส่วนของน้ำและแอลกอฮอล์ ตรงกลางเป็นส่วนของกากเซลล์ และส่วนล่างเป็นชั้นของ fatty acid methyl esters (FAMEs) และไตรกลีเซอรอล (triacylglycerol, TAG) บางส่วนที่เหลือและคลอโรฟอร์ม นำสารละลายส่วนล่างมาแยกตัวทำละลาย คลอโรฟอร์มออกด้วยวิธีการระเหย (Evaporation) เพื่อให้เหลือเพียงส่วนของไบโอดีเซลในรูปของ FAMEs, และ TAG (รูปที่ 4.29B)

(A) (B)

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

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเตรียมน้ำตาลจากมันเทศด้วยการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) ที่ 121°C 20 นาที หรือการใช้ความร้อนชื้นภายใต้ความดันไอ พบว่าการใช้มันเทศผงแห้ง (SHP2) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงกว่าการใช้มันเทศสด (SPH1) โดยได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 14.48 g/L เมื่อใช้อัตราส่วนมันเทศผง (g): กรด (ml) เท่ากับ 1:15

เมื่อศึกษาระยะเวลาการเจริญและการผลิตลิปิดด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch cultivation) พบว่ายีสต์ *T. maleeae* Y30 เมื่อเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลจากมันเทศสด (SPH1) เป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ในวันที่ 1 และเข้าสู่ช่วงท้ายการเจริญ (late log phase) หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase ในวันที่ 3 ส่วนการเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลจากมันเทศผง (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ในวันที่ 1 และเข้าสู่ช่วงต้นของระยะ stationary phase ในวันที่ 8-9 ของการเพาะเลี้ยง การผลิตและสะสมลิปิดของเซลล์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญ จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อยีสต์เจริญใน SPH2 ให้ปริมาณลิปิดสูงกว่าเมื่อเจริญใน SPH1 โดยให้ปริมาณลิปิด 2.152g/L หรือ 28%โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) และปริมาณลิปิดที่ 0.462g/L หรือ 23.28%DCW สำหรับการใช้ SPH1 เมื่อเปรียบเทียบในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตลิปิด (Q_P) และอัตราการผลิตเซลล์ (Q_X) พบว่า SPH2 ให้ Q_P และ Q_X ที่ 0.269g/L/d และ 0.934g/L/d ตามลำดับซึ่งสูงกว่าการใช้ SPH1 ดังนั้นในจึงคัดเลือกมันเทศผง (SPH2) เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงและผลิตลิปิดจากยีสต์ *T. maleeae* Y30

เมื่อศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ *T. maleeae* Y30 พบว่าเมื่อใช้ yeast extract และยูเรีย (urea) ซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) จะส่งเสริมการเจริญได้ดีกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen) คือ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ โดยมีอัตราการผลิตเซลล์ (Q_X) สูงสุด 1.356g/L/d, 1.179g/L/d หรือมีผลได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$) ที่ 1.207 และ 0.945 เมื่อใช้ urea และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิปิดพบว่าการใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.18g/L หรือ 35.66%DCW และอัตราการผลิตลิปิด (Q_P) สูงสุดที่ 0.398g/L/d ส่วนการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ Q_X, $Y_{X/S}$, ปริมาณลิปิด และ Q_P เท่ากับ 1.022g/L/d, 0.155, 1.26g/L (16.05%DCW) และ 0.158g/L/d ตามลำดับ ส่วนการใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ Q_X, $Y_{X/S}$, ปริมาณลิปิด และ Q_P เท่ากับ 0.934g/L/d, 0.236, 1.77g/L (23.06%DCW) และ 0.221/L/d ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษานี้

เมื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ yeast extract ต่อการเจริญและการผลิตลิปิดพบว่าเมื่อใช้ yeast extract 0.75g/L ให้ปริมาณเซลล์ต่ำสุด 9.82g/L (Q_X, 1.227g/L/d) ในขณะที่ yeast extract 1.50g/L ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 16.07g/L (Q_X, 1.783g/L/d) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิปิดพบว่าไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 0.75, 1.0, 1.25, 1.50g/L โดยให้ปริมาณลิปิด 3.40 g/L (35.05%DCW), 3.98g/L (37.55%DCW), 4.05g/L (25.39%DCW), 3.97g/L(28.68%DCW) แต่เมื่อเทียบเป็นอัตราการผลิตลิปิด (Q_P) ได้เท่ากับ 0.425, 0.498, 0.506, 0.497g/L/d ในอาหารที่มี yeast extract 0.75, 1.0, 1.25, 1.50g/L ตามลำดับ และผลได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 1.003, 1.134, 1.443, 1.644 ในอาหารที่มี yeast extract 0.75, 1.0, 1.25, 1.50g/L ตามลำดับ ปริมาณผลได้ของลิปิด ($Y_{P/X}$) เท่ากับ 0.347, 0.352, 0.284, 0.247 ในอาหารที่มี yeast extract 0.75, 1.0, 1.25, 1.50g/L ตามลำดับ เมื่อพิจารณา Q_X, Q_P, $Y_{P/X}$ สามารถเลือกใช้ปริมาณ yeast extract 1.25-1.5g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน

เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหาร LAM medium ที่มี SPH2 เป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ 4000mL ปริมาตรอาหาร 2000mL บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน พบว่าได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 16.89g/L ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณลิปิดสูงสุด 5.02g/L หรือ 29.73%DCW

ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในรูป fatty acid methyl esters (FAMEs) แบบโดยตรงจากเซลล์ยีสต์แห้ง (direct transesterification) ตามวิธีการที่ดัดแปลงของ Bradley and Robert (2011) เมื่อวิเคราะห์คุณภาพโดยหาปริมาณค่าของกรด (acid value) โดยไตเตรทสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลาย 0.1 N KOH พบว่ามีปริมาณค่าของกรดเท่ากับ 3.29 mgKOH/g ของ FAME และมีปริมาณไบโอดีเซลเท่ากับ 60.1% ของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่าปริมาณเซลล์และลิปิดยังไม่สูงมากนักอาจเนื่องมาจากกระบวนการผลิตยังไม่เหมาะสม ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญและผลิตลิปิดคือแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน การลดต้นทุนการผลิตที่สามารถทำได้อีกประการหนึ่งคือการหาแหล่งไนโตรเจนราคาถูก เช่น การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ (organic fertilizer) หรือน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) เป็นต้น

การศึกษานี้เป็นการเพาะเลี้ยงแบบกะซึ่งมีข้อจำกัดของปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อทั้งการเจริญและการผลิตลิปิดเนื่องจากเป็นการให้แหล่งคาร์บอนรวมทั้งแหล่งไนโตรเจนเพียงครั้งเดียวในช่วงต้นของการเพาะเลี้ยงซึ่งทำให้ได้ผลผลิตไม่สูงมากนักทั้งปริมาณเซลล์และปริมาณลิปิด ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงควรศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบกะป้อน (fed-batch cultivation) ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าให้ผลผลิตสูงทั้งปริมาณเซลล์และลิปิดพร้อมกัน

การผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นโดยตรงจากเซลล์ยีสต์เป็นวิธีหนึ่งที่จะลดต้นทุนในการผลิตลงโดยการลดสารเคมีและตัวทำละลายในการสกัดลิปิดหรือน้ำมันออกจากเซลล์ดังนั้นจึงต้องศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีการดังกล่าว เช่น การหาชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสม การใช้ไมโครเวฟหรืออัลตราโซนิคช่วยในการทำปฏิกิริยาเป็นต้น นอกจากนั้นควรศึกษาการลดปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์ลงเพื่อให้ได้น้ำมันที่ใสมากขึ้น

นอกจากนั้นควรศึกษาการผลิตลิปิดหรือไขมันร่วมกันโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงร่วมกับสาหร่ายขนาดทั้งระบบการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อผสม (Mixed-culture system) กับสาหร่ายที่สามารถเจริญแบบเฮเทโรโทรฟิคได้ เช่น *Chlorella* sp. KKU-S2, *Chlorella* sp. MSU2 และหรือระบบการเพาะเลี้ยงแบบบูรณาการ (integrated culture system) ระหว่างยีสต์กับสาหร่ายขนาดเล็ก โดยการนำคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ต่อเข้ากับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้งแบบการเพาะเลี้ยงภายใต้การสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) โดยสาหร่ายใช้ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอน และการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะมิกโซโทรฟิก (mixotrophic cultivation) ที่สาหร่ายสามารถใช้ทั้ง CO_2 และสารอินทรีย์ เช่น กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งระบบการผลิตลิปิดผ่านทั้ง mixed-culture system และ integrated culture system อาจทำให้ผลผลิตลิปิดสูงขึ้นนอกจากนั้นยังเป็นการใช้ CO_2 ให้เกิดประโยชน์สูงสุดซึ่งเป็นการลดการปล่อย CO_2 ออกสู่บรรยากาศได้อีกทางหนึ่งด้วย

บรรณานุกรม

1. ด้วง พุธศุกร์. (2534). ไขมันและเคมีภัณฑ์จากไขมัน โครงการตำราและเอกสารประกอบการเรียน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. หน้า 23-28.
2. ประหยัด โกมารทัต. (2537). ลิปิด : โครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติทั่วไป การประชุมปฏิบัติการภาคฤดูร้อน สาขาชีวเคมี ครั้งที่ 19 เรื่อง ลิปิด ชีวเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ วันที่ 4 พฤษภาคม กรุงเทพมหานคร. หน้า 6-16.
3. รัตนภรณ์ ลีสิงห์. (2551). การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 36 : 129-138.
4. Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G.M. (2008). Conversion of sewage sludge into lipid by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. Bioresour Technol. 99: 3051-3056.
5. Bradley, D. W., Robert, M. W., Lance, C. S. (2011). Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. Bioresour Technol. 102(3): 2724-2730.
6. Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. J. Biosci. Bioeng. 92:405-416.
7. Gill, C.O., Hall, M., Ratledge, C. (1997). Lipid accumulation in an oleaginous yeast (Candida 107) growing on glucose in single-state continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 33: 231-239.
8. Hassan, M., Blanc, P.J., Grangerf, M.L., Pareilleux, A., Goma, G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. Process Biochem. 31: 355-361.
9. Hanh, H.D., Dong, N.T., Okitsu, K., Maeda, Y. (2009). Biodiesel production through transesterification of triolein with various alcohols in an ultrasonic field. Renewable Energy, 34:766-768.
10. Haas MJ, Scott KM, Foglia TA, Marmer WN. (2007). The general applicability of in situ transesterification for the production of fatty acid esters from a variety of feedstocks. J Am Oil Chem Soc 84:963–970.
11. Huang Chang, Y, Changa, K-S, Hsu, C-L, Lu-Te Chuang, Chien-Yu Chen, Fu-Yu Huang, Jang, H-D (2013) A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast Cryptococcus sp. in glucose-based media and corncob hydrolysate for microbial oil production. Fuel 105: 711-717.
12. Huang C, Zong MH, Wu H, Liu QP (2009) Microbial oil production from rice straw hydrolysate by Trichosporon fermentans. Bioresour Technol. 100 (19):4535-4538.

13.Johnson, V., Singh, M., Saini, V.S., Sista, V.R., Yadav, N.K. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. World J. Microbiol. Biotechnol. 8: 382-384.
14.Kwon, DY, Rhee, JS. (1986). A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. J Am. Oil Chem. Soc. 63:89-92.
15.Knothe, G. 2006. Analyzing biodiesel: standards and other methods. J. Am Oil Chem. Soc. 83:823-833.
16.Leesing, R., Nontaso, N. (2011). Isolation and cultivation of oleaginous yeast for microbial lipid production. KKU Research Journal, 16 (2): 8-22.
17.Leesing, R., Karraphan, P. (2011). Kinetic growth of the isolated oleaginous yeast for lipid production. Afri. J. Biotech. 10 (63): 13867-13877.
18.Lim, S., Teong, L.K. (2010). Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: an overview. Renew Sust Energy Rev 14:938–54.
19.Li, Y.-H., L., Bo, L., Zong-Bao, Z., Feng-Wu, B. (2006). Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. Chinese J. Biotechnol., 22: 650-656.
20.Li, Y, Zhao, Z., Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. Enzyme Microbiol. Technol. 41: 312-317.
21.Meesters, P.A.E.P., Huijberts, G.N.M., Eggink, G. (1996). High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 575-579.
22.Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 426-428.
23.Moon, N.J., Hammond, E.D., Glatz, B.A. (1978). Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single-cell protein. J. Dairy Sci. 61:1537-1547.
24.Moreten, R.S. (1988). Physiology of lipid accumulation yeast, In: Moreten, R.S., editor. Single cell oil. London: Longman. P. 1-32.
25.Munglia, L., Kiss, L.N., Fonteix, C., Marc, I. (2005). Multicriteria optimization of a single-cell-oil production. European J. Operational Research 153: 360-369.
26.Papanikolaou, S., Komiaitis, M., Aggelis, G. (2004). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grownon high-sugar content media. Bioresour Technol. 95: 287-291.
27.Ratledge, C. (1991). Microorganisms for lipids. Acta Biotechnol. 11:429-438.
28.Ratledge, C. (1981). Yeast and mould as sources of oils and fats: New sources of fat and oils. In eds. Mukherjee, K.D. American Oil Chemists' Society Champainge, IL. Pp. 159-169.

29.Ratledge, C., James, P.W. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 51: 1-51.
30.Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochimie 86: 807-815.
31.Ratledge, C., James, P.W. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 51: 1-51.
32.Ratledge C, Tan KH (1990) Oils and fats: production. Degradation and utilization by yeasts. In: Verachtert H, De Mot R (eds) Yeast Biotechnology and Biocatalysis. New York: Marcel Dekker, pp 223–254.
33.Samios D, Pedrotti F, Nicolau A, Reiznautt QB, Martini, D.D., Dalcin, F.M. (2009) A transesterification double step process – TDSP for biodiesel preparation from fatty acids triglycerides. Fuel Processing Technology, 90:599-605.
34.Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. Biochimica et Biophysica Acta. 1771: 255-270.
35.Terry, K.L., Raymond, L.P. (1985). System design for the autotrophic production of microalgae. Enzyme Microbiol. Technol. 7:474-487.
36.Turcotte, A., Kosaric, N. (1989). The effect of C/N ratio on lipid production by *Rhodosporidium toruloides* ATCC10788. Biotechnol. Lett. 9: 637-642.
37.Vargas, V.A., Delgado, O.D., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B. (2004). Lipase-producing microorganisms from a Kenya alkaline soda lake. Biotechnol. Letters 26:81-86.
38.Vega, E.Z., Glatz, B.A., Hammond, E.G. (1988). Optimization of banana juice fermentation for the production of microbial oil. Appl. Environ. Microbiol. 54: 748-752.
39.Xue, F., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. (2006). A new method for preparing raw material for biodiesel production. Process Biochem. 41:1699-1702.
40.Zhu, L.Y, Zong, M.H., Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. Bioresour Technol. 99: 7881–7885.
41.Xu, J, Zhao, X, Wang, W, Du, W, Liu, D. (2012). Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. Biochem Eng. J. 65 (2012) 30– 36.
42.Zhang, J, Xu Fang, X, Zhu, X.L, Li, Y, Xu, HP, Zhao, BF, Chen, L, Zhang, XD. (2011). Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. Biomass and Bioenergy 35: 1906-1911.

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (mg/L)

1) Lipid accumulation medium (g/L) **สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์**

Glucose	20	g
$(NH_4)_2SO_4$	0.1	g
Yeast powder (extract)	0.75	g
$Mgso_4.7H_2O$	1.5	g
KH_2PO_4	0.4	g
$ZnSO_4$	4.4	mg
$CaCl_2$	25	mg
$MnCl_2$	0.05	mg
$CuSo_4$	0.3	mg
น้ำกลั่น	1	L

pH 5.0

2) YM medium สำหรับเก็บรักษายีสต์

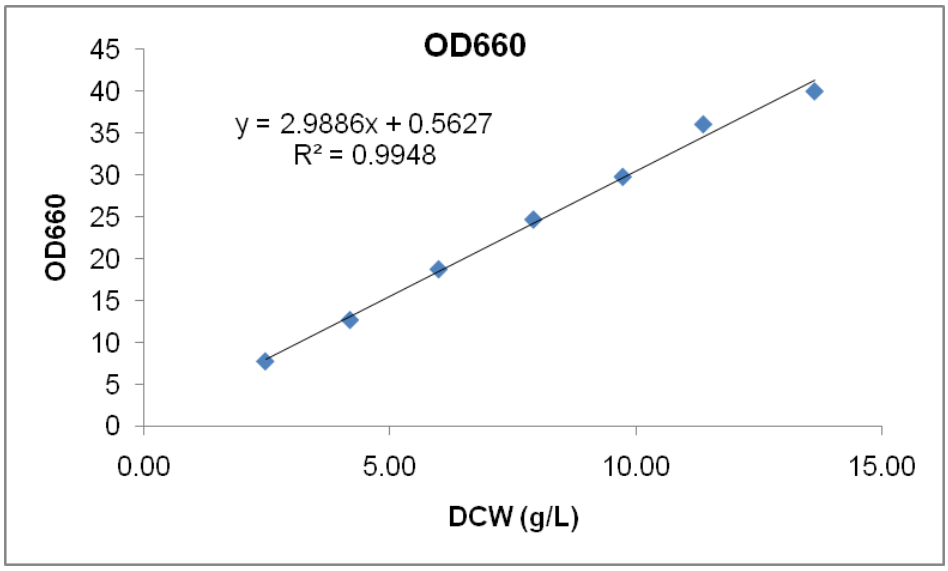
Glucose	10	g
Yeast extract	3	g
Malt extract	3	g
Peptone	5	g
น้ำกลั่น	1	L

pH 4.0

2. การวัดการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง (dry weight method)

อบกระดาษกรองหรืออลูมิเนียมฟอยล์ที่พับเป็นรูปกระทง อบที่ 90 ℃ นาน 4 ชม. นำไปทำให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด ปิเปตสารแขวนลอยเชื้อ (suspension) ของเชื้อลงในหลอด centrifuge ปริมาตร 5 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ถ่ายสารแขวนลอยเชื้อลงในกระทงจากนั้นนำไปอบที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 ชม. ทำให้เย็นในโถอบแห้งแล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือ น้ำหนักของเซลล์จุลินทรีย์ต่ออาหาร 5 mL

การวัดการเจริญโดยวัดค่าความขุ่น (optical density) โดยเก็บตัวอย่างเซลล์มาวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่นที่ 660 (OD660) จากนั้นเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD660 และค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ (biomass) ดังรูปที่ ก-1



รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่น (OD660) และน้ำหนักแห้งของยีสต์ *Torulaspora maleeae* Y30

3. การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ตามวิธีของ DNS (Miller, 1959)

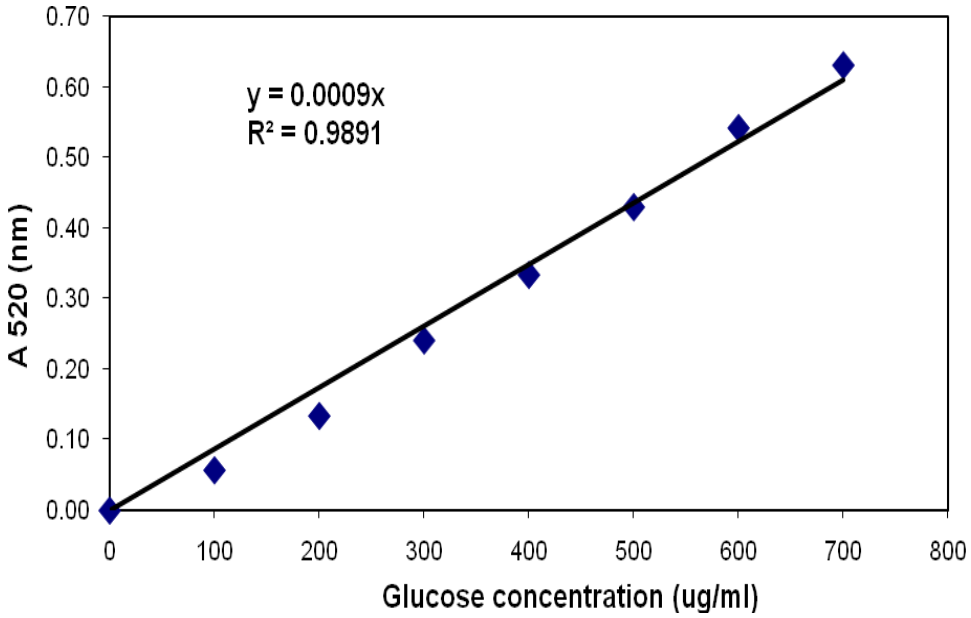
สารเคมี

1. 2 N NaoH
2. DNS solution : เตรียมโดยละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 g ใน 50 mL ของ 2 N NaOH โดยค่อยๆ เติมและคนจนละลาย จากนั้นเติม Sodium potassium tatrate (Rochelle salt) 7.5 g คนจนละลายเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 mL เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการทดลอง

1. ดูดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลมา 0.1-1.0 mL ใส่ลงในหลอดแก้ว ใช้น้ำกลั่นเป็น blank เติม DNS solution 1 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และปิดปากหลอดในระหว่างต้ม ทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในอ่างน้ำเย็น

2. เติมน้ำ 10 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm (A520) และนำค่าไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส อ่านค่าความเข้มข้นของกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากการทดลองวิธีเดียวกันโดยใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700µg/mL



รูปที่ ก-2 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

4. การวิเคราะห์กรดไขมันโดยวิธีวัดสี Colorimetric method: Know and Rhee

สารเคมี

1. สารละลาย Copper reagent

ชั่ง cupric acetate 25 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 mL ปรับ pH 6.1 ด้วย pyridine ปรับปริมาตรเป็น 500 mL ด้วยน้ำกลั่น กรองก่อนเก็บไว้ใช้ (สารละลายคงตัวได้ 2 ปี ในที่ไม่มีแสง)

2. สารละลาย 1.5 M KOH ใน ethanol 80%

ชั่ง KOH 84.165 g ละลายใน ethanol 80% (absolute ethanol 99.1%, 80 mL+ 20 mL น้ำกลั่น) ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 mL

3. สารละลาย 2.5 M HCl

การเตรียม Cell suspension ของจุลินทรีย์

โดยชั่งเซลล์น้ำหนักเปียกมา 1 g ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปรับปริมาตรเป็น 10 mL จะได้สารแขวนลอยเซลล์ 0.1 g/mL

การสกัดลิปิดจากเซลล์จุลินทรีย์

1. การสกัดลิปิดทำโดยการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์และสกัดลิปิดออกจากเซลล์โดยการซาพอนนิฟิเคชั่นด้วย 1.5 M KOH ในเอทานอล 80% ทำโดยนำ cell suspension มา 1 mL ใส่ในหลอดจุกเกลียว ขนาด 20 mL เติม 1.5 M KOH ในเอทานอล 80% จำนวน 4 mL ปิดจุกให้แน่น ต้มให้เดือด 2 ชั่วโมง

2. เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลง เติม 2.5 M HCl จำนวน 6 mL และ isooctane 5 mL เขย่าอย่างแรง 200-300 ครั้ง/นาที เพื่อสกัดไขมันอิสระออกมาอยู่ในชั้นของ isooctane เพื่อนำไปหาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธี colorimetric method

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดด้วยวิธี Colorimetric method

สารละลายกรดไขมันมาตรฐาน (stock solution) : 10 mg/mL โดยชั่งกรดไขมันปาลมิติค 1.0 g ละลายใน isooctane ปรับปริมาตรเป็น 100 mL

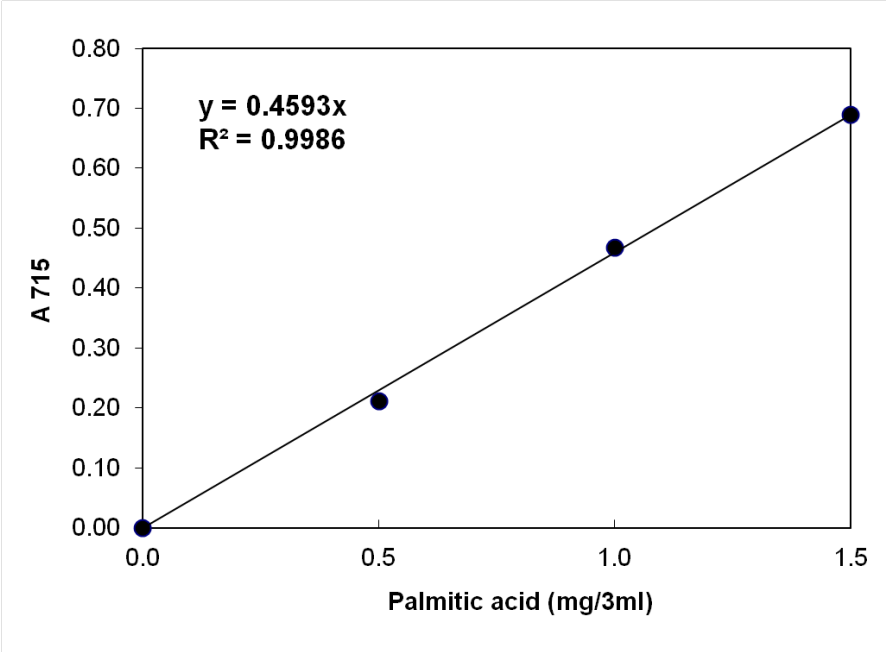
1. ทำเตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ จากสารละลายกรดปาลมิติค 10.0 mg/mL นำมาเจือจางด้วย isooctane ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง

ความเข้มข้นของสารละลายกรดปาลมิติค (mg/3 mL solution)	ปริมาตร stock standard (mL)	ปริมาตรของ isooctane (mL)
0.5	0.15	2.85
1.0	0.30	2.70
1.5	0.45	2.55
2.0	0.60	2.40

2. ปิเปตแต่ละระดับความเข้มข้นมา 3 mL เติม copper reagent 1.0 mL ปิดจุกเขย่าแรงๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 715 nm ทำกราฟมาตรฐาน (standard curve)

3. การหาปริมาณกรดไขมันในเซลล์จุลินทรีย์

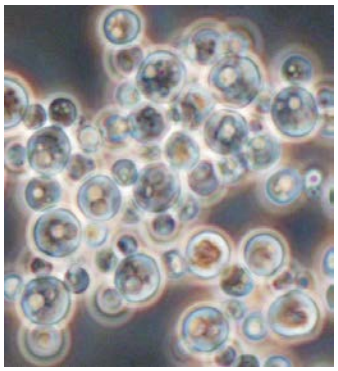
ทำโดยปิเปตสารละลายสกัดไขมันจากจุลินทรีย์ในข้อ 3. (การสกัดลิปิดจากเซลล์จุลินทรีย์) มา 3 mL ทำปฏิกิริยากับ copper reagent 1.0 mL ปิดจุกเขย่าแรงๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 715 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve)



รูปที่ ก-3 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของกรดปาลมิติก (palmitic acid) สำหรับการวิดคราะห์ปริมาณลิปิดด้วยวิธีวัดสี (Colorimetric method) ตามวิธีของ Know and Rhee (1986)

5. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์พื้นถิ่นที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ คือ *Torulaspora maleeae* Y30



(A) (B) (C)

รูปที่ ก-4 ยีสต์ *Torulaspora maleeae* Y30 ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM agar plate (A) การเก็บรักษาใน agar slant (B) และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X (C)

6. ขั้นตอนการเตรียมน้ำตาลจากหัวมันเทศ

1. มันเทศปอกเปลือก 2. บดมันเทศด้วยเครื่องบด

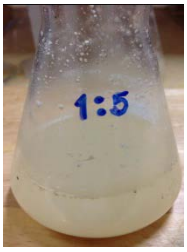
3. เติมน้ำและกรด HCl ที่อัตราส่วนต่างๆ 4. หลังจากการต้มในหม้อนึ่งความดันไอ

รูปที่ ก-5 การเตรียมน้ำตาลจากหัวมันเทศสด (SPH1)

1. มันเทศปอกเปลือก

2. หั่นเป็นแว่นและอบแห้ง

3. บดละเอียดและมันเทศผงละเอียด



4. เติมกรด HCl ที่อัตราส่วนต่างๆ และนำไปต้มในหม้อนึ่งความดันไอ 121C, 20นาที

5.น้ำตาลจากมันเทศผงภายหลังการกรองและปั่นเปวิ่งเพื่อกำจัดกากออก

รูปที่ ก-6 การเตรียมน้ำตาลจากหัวมันเทศแห้ง (SPH2)

รูปที่ ก-7 การเพาะเลี้ยงยีสต์ *T. maleeae* Y30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM medium ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch fermentation) ในฟลาสก์ขนาด 1000mL ปริมาตรอาหาร 500mL บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150rpm ในอาหาร LAM ที่มี Potato hydrolysate และ sweet potato hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอน

ประวัติและผลงานนักวิจัย

1. ชื่อ/ สกุล: นางสาวรัตนภรณ์ ลีสิงห์ (Miss Ratanaporn LEESING)

2. ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002
โทรศัพท์ /โทรสาร 0-4320 2377 มือถือ: 08 5002 2489, e-mail: ratlee@kku.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อเต็ม และ อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2549	เอก	Doctorat (Diplôme de Docteur)	Sciences des Aliments (วิทยาศาสตร์อาหาร)	Université Montpellier II, Montpellier	ฝรั่งเศส
2539	โท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)	เทคโนโลยีชีวภาพ	ม. เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	ไทย
2530	ตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)	ชีววิทยา (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

5. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์/เผยแพร่ (บางส่วน)

Leesing, R., Sihawong, S., Duangkeaw, N. (2013) Producing of Microalgal Lipid by Isolated Microalgae under Photoautotrophic and Heterotrophic Cultivation. APCBEE Procedia

Leesing, R., Puangbut. (2013) Producing of microbial lipid via the integrated growth of microalgae and yeast fermentation**.** Current Opinion of Biotechnology, 24 :S136-137.

V. Sirisan, V. Pattarajinda, K. Vichitphan and **R. Leesing**. (2013) Isolation, identification and growth determination of lactic acid-utilizing yeasts from the ruminal fluid of dairy cattle. Letters in Applied Microbiology, 57:102-107.

Leesing, R., Baojungharn, R., Papone, T. (2012) Microbial Oil Production by Mixed Culture of Microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2 and Yeast *Torulaspora maleeae* Y30. World Academy of Science, Engineering and Technology 64 2012: 1055-1058.

Paungbut, M**., Leesing, R**. (2012) Integrated Cultivation Technique for Microbial Lipid Production by Photosynthetic Microalgae and Locally Oleaginous Yeast. World Academy of Science, Engineering and Technology 64 2012: 975-979.

Papone, T., Kookkhuntod, S**., Leesing, R.** (2012) Microbial Oil Production by Monoculture and Mixed Cultures of Microalgae and Oleaginous Yeasts using Sugarcane Juice as Substrate. World Academy of Science, Engineering and Technology 64 2012: 1127-1131.

Leesing, R., Kookkhunthod, S., Subinnam, P. (2012) Heterotrophic Microalgal Oil Production by *Chlorella* sp. KKU-S2 Using Agricultural Residues Hydrolysates as Carbon Substrate. KKU Science Journal. 40 (supplement): 237-242.

Srivicha, A., **Leesing, R.** (2012) Microbial Lipid Production by Locally Isolated Oleaginous Yeast. KKU Science Journal. 40 (supplement): 223-231.

Leesing, R., Karraphan, P. (2011) Kinetic growth of the isolated oleaginous yeast for lipid production. African Journal of Biotechnology. 10(63): 13867-13877.

Leesing, R., Nontaso, N. (2011) Isolation and cultivation of oleaginous yeast for microbial lipid production. KKU Research Journal, 16 (2): 8-22.

Leesing, R., Kookkhunthod, S. (2011) Heterotrophic growth of *Chlorella* sp. KKU-S2 for lipid production using molasses as a carbon substrate. Proceedings of the International Conference on Food Engineering and Biotechnology, May 28-29, 2011, Bangkok, Thailand, pp. 87-91.

Leesing, R., Kookkhunthod, S., Nontaso, N. (2011) Microalgal lipid production by microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology 76 2011, April 27-29, 2011, Venice, Italy, pp 441-444.

Leesing, R., Baojungharn, R. (2011) Microbial Oil Production by Isolated Oleaginous Yeast *Torulaspora globosa* YU5/2. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology 76 2011, April 27-29, 2011, Venice, Italy, pp 1088-1092.

Leesing, R., Dijoux, D., Le Nguyen, D.D., Loiseau, G., Ramesh Chandra Ray, R.C., and Montet, D. (2011) Improvement of DNA Extraction and Electrophoresis Conditions for the PCR-DGGE Analysis of Bacterial Communities Associated to Two Aquaculture Fish Species. Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology 5: 83-87.

Boonchaidung, S., **Leesing, R.,** (2011) Isolation and cultivation of lipase-producing yeast from oil-contaminated soil samples. Proceeding of the 3rd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (STGMS)". March 24-25, 2011, Luang Prabang, LAO People's Democratic Republic. Abstract p.83**.**

Papone, T., Kookkhunthod, S., and **Leesing, R.,** (2011) Fed-batch heterotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella* sp. KKU-S2 for lipid production. Proceeding of the 3rd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (STGMS)". March 24-25, 2011, Luang Prabang, LAO People's Democratic Republic. Abstract p.84. *(Corresponding author)*

Leesing, R., Bamrungpakdee, K., Kookkhunthod, S., Saikaew, O., Subinnam, P. (2011) Isolation of lipase-producing bacteria from soil samples. Proceeding of the 3rd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (STGMS)". March 24-25, 2011, Luang Prabang, LAO People's Democratic Republic. Abstract p.82.

Leesing, R., Nontaso, N. (2010) Microalgae oil production under heterotrophic cultivation. KKU Research Journal 15(9):789-793.

Leesing, R., Subinnam, P., Papone, T. (2010) Microalgal oil production from agricultural residue hydrolysates under heterotrophic cultivation. Proceeding of the Lignobiotech One Symposium: 1st Symposium on Biotechnology Applied Lignocelluloses. 28 March-1 April 2010, Reims, France.

Montet, D., Le Nguyen, D.D., **Leesing, R.**, Goli, T., Loiseau, G. (2009) Application of PCR-DGGE Method in Determining Origin of fish: Case studies of Pangasius fish from Vietnam, Tilapia from Thailand and sea bass from France. *In* Montet, D. and Ray, R.C. (editors) Aquaculture Microbiology and Biotechnology; Volume 1, August 2009. Science Publishers (USA). p.41-71. (http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b10182-3)

Leesing, R., Samhadthai, S., Nontaso, N. (2009) Microalgal oil production by green microalgae under heterotrophic cultivation. Proceeding of The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. August 26-28, 2009, Khon Kaen, Thailand.

Leesing, R., Nontaso, N. (2008) Isolation and cultivation of oleaginous green microalgae for lipid production. Proceeding of the Second International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (STGMS), October 2-3, 2008, Hanoi, Vietnam.

Leesing, R., Srinophakun, P., and Laoteng, K. (2009) Isolation and optimization of microbial lipid production by locally oleaginous yeast isolated from soil samples. Poster presentation at the 9th TRF, Young and Senior Scientist Meeting, 15-17 October 2009, Petchaburi, Thailand.

Leesing, R., Samahadthai, S., Nontaso, N. (2009) Microalgal oil production by green microalgae under heterotrophic cultivation. Poster presentation at The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. August 26-28, 2009, Khon Kaen, Thailand.

Leesing, R., Nontaso, N. (2008) Isolation and cultivation of oleaginous green microalgae for lipid production. Poster presentation at "The Second International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (STGMS)". 2-3 October 2008, Hanoi, Vietnam.

Leesing, R., (2007) Biodiesel from microalgal oil: Review. KKU Science Journal, 35 (4): 135-143.

Leesing, R., Gemrot, F., Loiseau, G., Montet, D. (2004) Development of an efficient method for bacterial diversity analysis: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). "Seminar on Food safety and International Trade: The French-Thai approach and the EU regulation", September 8-9, 2004, Thailand. Oral presentation.