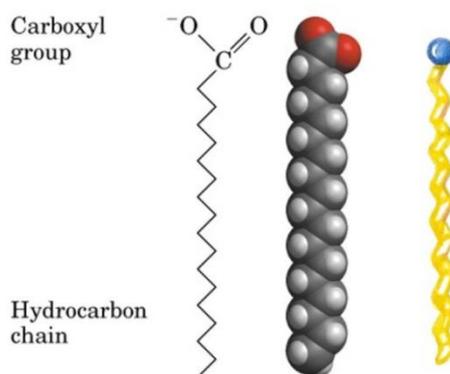


บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดไขมัน

กรดไขมันเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่พบในไขมันอย่างง่ายและไขมันเชิงประกอบ กรดไขมันทุกตัวประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน มีหมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) แสดงความเป็นกรดต่อกับไฮโดรคาร์บอนสายยาว สูตรทั่วไปคือ R-COOH โดยที่ R คือส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอน ประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนอะตอมต่อกันด้วยพันธะเคมี ดังภาพที่ 2.1 กรดไขมันในธรรมชาติส่วนมากมีคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 2 เป็นต้นไป(อุษณีย์ วจิเขตคานวณ, 2547)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดไขมัน

กรดไขมันแบ่งตามความต้องการของร่างกายได้เป็น 2 ประเภทคือ กรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) และกรดไขมันไม่จำเป็น (non-essential fatty acid) กรดไขมันจำเป็นหมายถึงกรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองต้องได้รับจากอาหารเท่านั้นและถ้าร่างกายขาดแคลนอาจทำให้เกิดอันตรายได้ กรดไขมันจำเป็นมี 2 ตระกูลคือ ตระกูลลิโนเลอิก (linoleic; 18:2 n-6) และตระกูลลิโนเลนิก (linolenic; 18:3 n-3) (Lee, 1997) กรดไขมันจำเป็นทั้ง 2 ตระกูลนี้จำเป็นต้องใช้เพื่อการสังเคราะห์กรดไขมันอื่นๆ และสารที่จำเป็นต่อร่างกายโดยไม่มีโครงสร้างทดแทนข้ามตระกูล คือตระกูลลิโนเลอิกนำไปสร้างกรดไดโฮโมแกมมาลิโนเลนิก (dihomogamma-linolenic acid; 20:3 n-6; GLA) กรดอาราชิโดนิก (arachidonic acid; 20:4 n-6; AA) และกรดแอดเรนิก (adrenic acid; 22:5 n-6) ส่วนตระกูลลิโนเลนิกนำไปสร้างกรดอีโคซาเพนตะอีนิก (eicosapentaenoic acid; 20:5 n-3; EPA) กรดโดโคซาเพนตะอีนิก (docosapentaenoic acid; 22:5 n-3; DPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีนิก (docosahexaenoic acid; 22:6 n-3; DHA) กรดไขมันจำเป็นทำหน้าที่คือเป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลต่างๆ ควบคุมการเมแทบอลิซึมของลิโปโปรตีนทำให้สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดซึ่งจะช่วยลดภาวะหลอดเลือดแข็งและหัวใจขาดเลือด และยังเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารพรอสตาแกลนดินส์ (prostaglandins) ซึ่งเป็นสารคล้ายฮอร์โมนทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย เช่น

การหลั่งกรดเกลือในกระเพาะอาหาร การหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของอวัยวะภายใน การควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย การรวมตัวของแผ่นเลือด เป็นต้น กรด EPA และกรด DHA ยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและรักษาอาการอักเสบต่างๆ และโรคกระเพาะบางชนิด กรด DHA เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อสมองและเซลล์ประสาท เป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยในการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อสมองในเด็กทารก ช่วยป้องกันอาการพิการทางสมองรวมถึงโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) แหล่งของกรด DHA ที่สำคัญคือน้ำมันแม่ซึ่งมีมากกว่านมโคถึง 30 เท่า โดยแหล่งของกรด DHA และกรด EPA ในเชิงพาณิชย์คือน้ำมันปลา (fish oil) เช่น ปลาเมนฮาเดน (menhaden) ปลาเฮอริง (herring) และปลาคอด (cod) และแหล่งธรรมชาติอื่นๆ เช่น ไข่ เมล็ดพืชบางชนิด แต่ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการจึงได้มีการค้นหาจากแหล่งอื่นๆ มาทดแทน ซึ่งพบว่าแหล่งจากจุลินทรีย์กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถสะสมไขมันได้ โดยไขมันที่ได้จากจุลินทรีย์จะเรียกว่าไขมันเซลล์เดี่ยว (single cell oil, SCO) ซึ่งมักเป็นไขมันที่บริโภคได้ (edible oil) พบในรา ยีสต์ แบคทีเรียและสาหร่าย

2.1.1 การจัดจำแนกชนิดของกรดไขมัน

กรดไขมันที่ได้จากการนำไตรกลีเซอไรด์มาไฮโดรไลซ์จะเป็นโซ่ตรง และมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่อยู่ระหว่าง 12-24 อะตอม กรดไขมันที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมีประมาณ 40 ชนิด ซึ่งโครงสร้างของกรดไขมันประกอบด้วยส่วนของไฮโดรคาร์บอนและหมู่คาร์บอกซิล กรดไขมันอาจมีพันธะเดี่ยวหรือพันธะคู่ ดังนั้นจึงจำแนกชนิดของกรดไขมันออกเป็น 2 ชนิดคือ

2.1.1.1 กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (Saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่โมเลกุลมีความอิ่มตัว โดยคาร์บอนอะตอมจะเรียงต่อกันด้วยพันธะเดี่ยว (single bond) ทั้งหมด ดังภาพที่ 2.2 มีสูตรทั่วไปคือ $C_nH_{2n}O_2$ หรือ $C_nH_{2n+1}COOH$ หรือเขียนสูตรได้เป็น $CH_3(CH_2)_nCOOH$ เมื่อ n เป็นเลขจำนวนเต็ม สามารถจัดจำแนกกรดไขมันชนิดอิ่มตัวได้เป็น 4 กลุ่ม ตามความยาวของสายคาร์บอนอะตอมที่ต่อกันดังนี้ (Food and agriculture organization of the united nations, 2010)

จำนวนคาร์บอนอะตอม	ชนิดกรดไขมัน
3-7	กรดไขมันชนิดสายสั้น (short chain fatty acids)
8-13	กรดไขมันชนิดสายกลาง (medium chain fatty acids)
14-20	กรดไขมันชนิดสายยาว (long chain fatty acids)
ตั้งแต่ 21 ขึ้นไป	กรดไขมันชนิดสายยาวมาก (very long chain fatty acids)

กรดไขมันอิ่มตัวมีความเสถียร ไม่ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนทำให้ไม่เกิดการเหม็นหืน พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ แต่ส่วนใหญ่ในสัตว์จะมีไขมันอิ่มตัวมากกว่าพืช ไขมันชนิดนี้พบใน เนื้อหมู เนื้อวัว ไขมันจากกะทิ เนย ไข่แดง รวมถึงน้ำมันที่ได้จากพืชบางชนิดก็เป็นแหล่งไขมันอิ่มตัวด้วย เช่น กรดปาล์มิติก (palmitic acid) มีคาร์บอน 16 ตัว มีมากในน้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว ไขมันสัตว์และผลิตภัณฑ์นมเนย กรดไขมันชนิดนี้เป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีมากในธรรมชาติและพบในร่างกายโดยร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ ในทางโภชนาการจึงจัดอยู่ในไขมันประเภทที่ไม่จำเป็น กรดไขมันชนิดอิ่มตัวพบมากที่สุดคือกรดปาล์มิติก (palmitic acid) และกรดสเตียริก (stearic acid)

2.1.2 การเรียกชื่อกรดไขมัน

การเรียกชื่อกรดไขมันแสดงดังตารางที่ 2.1 โดยทั่วไปที่ใช้กันบ่อยๆ มักมีการเรียกตาม Geneva system คือ เรียกกรดไขมันตามจำนวนคาร์บอนอะตอม กรดไขมันไม่อิ่มตัวใช้ -oic แทนอักษร e ตัวสุดท้ายของไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นกรดไขมันอิ่มตัวจะลงท้ายด้วย -anoic เช่น octadecanoic acid ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่จะลงท้ายด้วย -enoic เช่น octadecaenoic acid ส่วนการให้หมายเลขหรืออักษรประจำของคาร์บอนอะตอม นั้น อาจให้ได้ทั้งจากทางด้านกลุ่ม carboxyl ซึ่งเป็นการเรียกการให้ตัวเองแบบ Δ numbering หรือระบบอักษรกรีก (Greek lettering system) และยังสามารถให้อักษรประจำคาร์บอนอะตอมตัวที่ไกลที่สุดจากกลุ่มคาร์บอกซิล เป็นแบบระบบหมายเลขแบบ n หรือ ω ดังเช่น

ปลาย ω	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	ปลาย carboxyl
การให้ตัวเลขแบบ Δ	10 9 8 7 6 5 4 3 2 1	
การให้ตัวเลขแบบ n หรือ ω	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	
letter designation	$\omega\omega-1 \delta\gamma\beta\alpha$	

การใช้อักษรกรีกเพื่อชี้คาร์บอนอะตอมต่างๆ โดยคาร์บอนอะตอมตัว α จะติดอยู่กับกลุ่ม carboxyl หรือเป็นคาร์บอนอะตอมของกลุ่มสุดท้ายนั่นเอง การเรียกชื่อกรดไขมันด้วยวิธี Δ numbering เป็นการเขียนจำนวนคาร์บอนอะตอมทั้งหมด จำนวนของพันธะคู่และตำแหน่งของพันธะคู่เช่น กรดปาลมิโตเลอิก (palmitoleic acid) จะเขียนแทนด้วย 16:1 Δ^9 ตัวเลขหลัง Δ ในระบบการเขียนนี้ แสดงตำแหน่งของพันธะคู่ที่สัมพันธ์กับกลุ่ม carboxyl เช่นตัวอย่างข้างต้นพันธะคู่ที่ไม่อิ่มตัวจะอยู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และตำแหน่งที่ 10 โดยนับจากคาร์บอนอะตอมของกลุ่ม carboxyl เป็นตัวที่ 1 ส่วนระบบการให้แบบ n หรือ ω จะเขียนกรดปาลมิโตเลอิก (palmitoleic acid) เป็น 16:1 n-7 หมายถึงกรดนี้มี 16 คาร์บอนอะตอมมี 1 พันธะคู่ที่ไม่อิ่มตัวโดยอยู่ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7 เมื่อนับจากคาร์บอนอะตอมตัว ω เนื่องจากกรดปาลมิโตเลอิกมี 16 คาร์บอนอะตอม ตัวพันธะคู่จะอยู่ตำแหน่งที่ 7 เมื่อนับจากคาร์บอนอะตอม ω และจะเป็นตำแหน่งที่ 9 เมื่อนับจากคาร์บอนอะตอมของกลุ่ม carboxyl (ธาตาลีปลิเนนจ์ และคณะ, 2535)

ตารางที่ 2.1 แสดงกรดไขมันสามัญ

ชนิด	ชื่อสามัญ (common name)	ชื่อตามระบบ (systematic name)	โครงสร้าง (structure)
กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid)	Capric acid	n-decanoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
	Lauric acid	n-dodecanoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
	Myristic acid	n-tetradecanoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
	Palmitic acid	n-hexadecanoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
	Stearic acid	n-octadecanoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
	Arachidic acid	n-eicosanoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
	Behenic acid	n-docosanoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
	Lignoceric acid	n-tetracosanoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
Corotic acid	n-hexacosanoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$	
กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid)	Palmitoleic acid	cis-9 hexadecenoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	Oleic acid	cis-9 octadecenoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	Linoleic acid	cis-9, 12- octadecadienoic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2$ $(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
	α -Linolenic acid	All-cis-9, 12, 15- octadecatrienoic acid	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$

ที่มา: ดัดแปลงจากสุกัญญา สุนทรสและวิเชียร ริมพณิชยกิจ(2547)

2.1.3 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดไขมัน

สมบัติทางกายภาพของกรดไขมัน

1) โครงสร้างของกรดไขมันประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วคือหมู่คาร์บอกซิล และส่วนที่ไม่มีขั้วคือสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกับหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นถ้าสายโซ่ยาวเพิ่มมากขึ้น กรดไขมันจะมีขั้วน้อยลง

2) จุดเดือดและจุดหลอมเหลวของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนหรือเพิ่มขึ้นตามจำนวนอะตอมคาร์บอน ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีจุดเดือดและจุดหลอมเหลวลดต่ำกว่าของกรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนเท่ากัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากันแต่มีพันธะคู่ต่างกัน จะพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าจะมีจุดเดือดและจุดหลอมเหลวลดต่ำกว่า

3) กรดไขมันที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนเท่ากัน แต่มีจำนวนพันธะคู่ต่างกัน จำนวนพันธะคู่ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้จุดหลอมเหลวลดลง

4) กรดไขมันในไตรกลีเซอไรด์จะมีขนาดโมเลกุลใหญ่ ไม่ละลายน้ำ แต่ถ้าอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม (Na) โปแตสเซียม (K) ของกรดไขมัน เช่น สบู่ สามารถละลายน้ำได้ (Rustan and Drevon, 2005)

สมบัติทางเคมีของกรดไขมัน

การเกิดปฏิกิริยาของกรดไขมันเกิดจากการแลกเปลี่ยนของหมู่คาร์บอกซิลในกรดไขมัน แสดง
ดังภาพที่ 2.4



(1) ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส

(2) ปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน

(3) ปฏิกิริยาอะซิโดลิซิส

(4) ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ลิซิส

(5) ปฏิกิริยาไกลเซอโรลิซิส

MAG; monoacylglycerol

DAG; diacylglycerol

TAG; triacylglycerol

ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลในกรดไขมัน

ที่มา: Scrimgeour (2005)

1) ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (Hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดต่างหรือเอนไซม์ไลเปส แต่การเกิดปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อไขมันและน้ำที่ละลายอยู่ในชั้นของไขมันมีอุณหภูมิและความดันที่เหมาะสม การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสในสภาวะที่เป็นต่าง เช่น การย่อยไขมันและน้ำมันด้วยด่างจนเกิดเป็นสบู่ เราเรียกการเกิดสบู่ที่ว่าปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน ในระดับห้องปฏิบัติการต่างที่นำมาใช้ในการทำปฏิกิริยามีความเข้มข้นต่ำ ปฏิกิริยาเกิดไม่รุนแรง แตกต่างจากในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งการผลิตกรดไขมันเกิดขึ้นโดยตรงจากการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำและไขมันภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันเหมาะสม (อุณหภูมิ ~260 °C ความดัน 20-60 บาร์) ปราศจากตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อสิ้นสุดกระบวนการมีกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้และสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไขมันได้ถึง 99% (Scrimgeour, 2005)

2) ปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) เป็นปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ ทำปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันกับแอลกอฮอล์โดยมีกรด หรือเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3) ปฏิกิริยาอะซิโดลิซิส (Acidolysis) เป็นปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันด้วยกรดหรือใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นกรดไขมันชนิดสายกลาง (medium chain fatty acids)

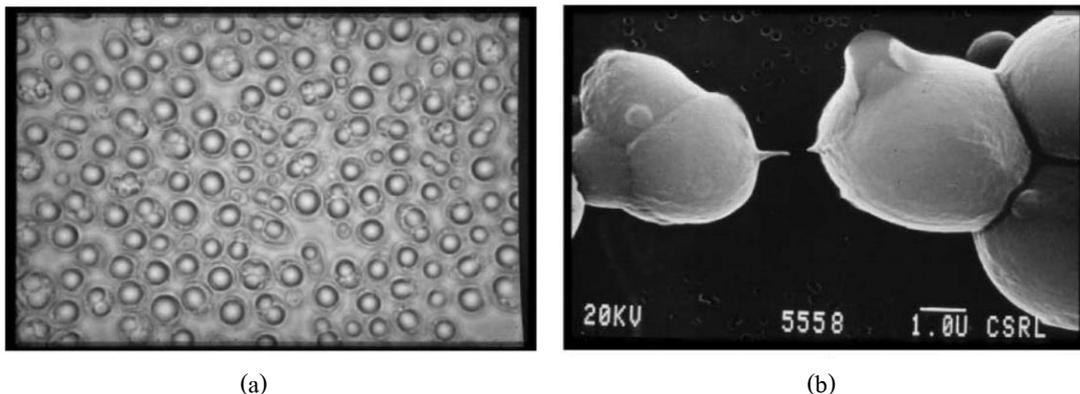
4) ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ลิซิส (Alcohololysis) หรือเรียกว่าปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Tranesterification) เป็นปฏิกิริยาเปลี่ยนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์เป็นเอสเทอร์ตัวใหม่ หรือโมโนแอลคิลเอสเทอร์ (mono-alkyl ester) และกลีเซอรอล

5) ปฏิกริยาไกลิเซอโรลิซิส(Glycerolysis) เป็นปฏิกริยาที่เกิดขึ้นระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับกลีเซอรอล มีตัวเร่งปฏิกริยาคือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) หรือโซเดียมเมทอกไซด์ (sodium methoxide) ได้โมโนและไดเอซิลกลีเซอรอลใช้เป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหารและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ

2.2 จุลินทรีย์สะสมไขมัน (Oleaginous microorganism)

นักวิทยาศาสตร์ค้นพบว่าจุลินทรีย์เป็นแหล่งสะสมไขมันเมื่อศตวรรษที่ 20 ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ปริมาณน้ำมันและไขมันขาดแคลนเป็นอย่างมาก ทำให้ประเทศเยอรมันนี้เริ่มมีการสำรวจหาแหล่งทางเลือกใหม่เพื่อทดแทนน้ำมันจากพืชให้เพียงพอต่อความต้องการ ไขมันในจุลินทรีย์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและมีศักยภาพเพียงพอในการนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซลได้เช่นเดียวกันกับน้ำมันจากพืช(Woodbine, 1959; Ratledge et al., 1992)

ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์สะสมไขมันมีกระบวนการสังเคราะห์ไขมันเกิดขึ้น โดยกรดไขมันที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ไขมันจะจับกับglycerol 3-phosphate ได้เป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล(triacylglycerol) และสะสมไว้ในเซลล์ดังภาพที่ 2.5 จุลินทรีย์ที่ผลิตไขมันได้จะเรียกว่าเป็น “จุลินทรีย์ไขมันสูง” (Oleaginous microorganism) น้ำมันที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์นอกจากจะนำมาใช้ทดแทนน้ำมันจากพืชในภาวะขาดแคลนน้ำมันแล้วยังสามารถนำมาใช้ในการบริโภคได้ ซึ่งเรียกกันในชื่อ ไขมันเซลล์เดี่ยว (Single cell oils, SCOs) หรือเป็นที่รู้จักกันในชื่อ โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein) จุลินทรีย์สะสมไขมันผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิดเช่น ยีสต์ รา แบคทีเรียและสาหร่าย ยกเว้นสิ่งมีชีวิตกลุ่มอาร์เคีย(Ma et al., 2006) โดยไขมันที่ผลิตได้ต้องมีปริมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้งขึ้นไป ส่วนจุลินทรีย์ที่สะสมไขมันภายในเซลล์แล้วให้ปริมาณไขมันน้อยกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง จะเรียกว่าเป็น “จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง” (non-oleaginous microorganism) (Huanget al., 2009) แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถสะสมไขมันได้สูงถึง 70% ของน้ำหนักแห้ง กรดไขมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์จะมองคร้ประกอบคล้ายคลึงกับกรดไขมันจากพืช องค์ประกอบหลักคือ ไตรกลีเซอไรด์(triglyceride) เป็นสารประกอบกลีเซอไรด์ที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน 3 ตัวอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน เช่น palmitic acid + oleic acid หรือ 2 palmitic acid + linoleic acid หรือ palmitic acid + stearic acid + oleic acid เป็นต้น ไตรกลีเซอไรด์เป็นผลผลิตหลักซึ่งอยู่ในรูปของหยดไขมันเล็กๆ ภายในเซลล์ต้องทำให้เซลล์แตกก่อนจึงสกัดออกมาได้ ไตรกลีเซอไรด์ที่พบในยีสต์จะมีกรดไขมันโอเลอิก(C18:1) ร้อยละ 40-50 กรดปาล์มิติก(C16:0) ร้อยละ 20-30 กรดสเตียริก(C18:0) ร้อยละ 15 และกรดลินโนเลอิก(C18:2) ร้อยละ 5 (Evan and Ratledge, 1983) และพบว่าจุลินทรีย์ไขมันสูงจะเหมือนเอนไซม์ ATP-citrate lyase ซึ่งต้องการ ATP และ Mg^{2+} โดยอาจใช้ Co^{2+} หรือ Mn^{2+} แทน Mg^{2+} ได้บางส่วน ATP-citrate lyase จะพบได้ทั้งในพืชและในสัตว์ แต่จะไม่พบเอนไซม์นี้ในจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง

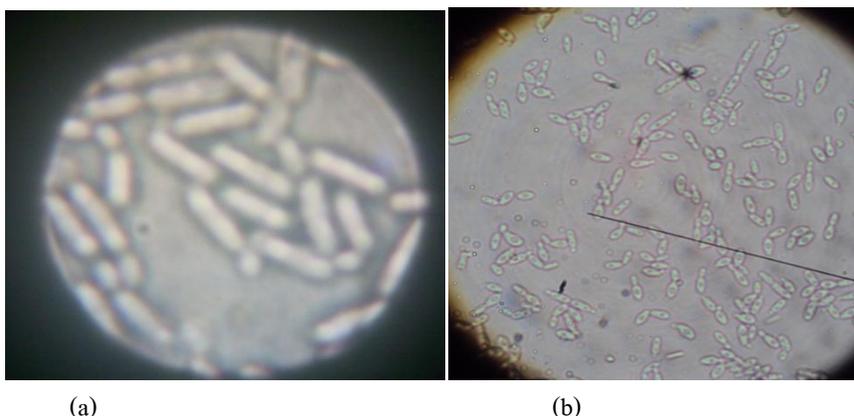


ภาพที่ 2.5 เซลล์ของยีสต์สะสมไขมัน *Cryptococcus curvatus* (ชื่อเดิม *Candida curvata*) (a) ไขมัน 70% ของ น้ำหนักเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (b) แสดงชั้นของหยดไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ที่มา: Wynn and Ratledge (n.d.)

2.3 ยีสต์และไขมันที่พบในยีสต์

ยีสต์ (yeast) จัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์พวกยูคาริโอตเป็นรากลุ่มหนึ่งที่มีส่วนใหญ่มิการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลมรี สามเหลี่ยม รูปร่างทรงกระบอกที่มีปลายมน รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง เป็นต้น ขนาดของเซลล์ยีสต์มีความผันแปรบางชนิดมีความยาว 2-3 ไมโครเมตร ในขณะที่บางชนิดมีความยาว 20-50 ไมโครเมตร ส่วนความกว้างของยีสต์อยู่ระหว่าง 1-10 ไมโครเมตร ยีสต์ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ (สาวิตริลิมทอง, 2549) สามารถพบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ในน้ำ ในส่วนต่างๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลงและในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่สามารถพบยีสต์อยู่บ่อยๆ คือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น ผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมักจะปนลงไปในอาหาร เป็นเหตุให้อาหารเน่าเสียได้ ยีสต์มีการใช้ในอุตสาหกรรมมานาน เช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein, SCP) ใช้ในการผลิตขนมปัง การผลิตแอลกอฮอล์ผ่านกระบวนการหมัก เป็นต้น ข้อได้เปรียบของยีสต์คือสามารถเจริญได้เร็วและเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายโดยการปั่นเหวี่ยง ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงและมีการสะสมไขมันสูงภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ตัวอย่างยีสต์ไขมันสูง เช่น *Yarrowialipolytica*, *Cryptococcus* sp., *Rhodotolura* sp. (รัตนภรณ์ ลีสิงห์, 2551^b) *Pichia* sp. Scj 01 เป็นยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จัดอยู่ในยีสต์ทนร้อน (thermotolerant) ที่คัดแยกได้จากน้ำอ้อย สามารถใช้วัตถุดิบหลากหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ทรีฮาโลส กลิเซอรอล น้ำเชื่อมจากมันเทศ เป็นต้น เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง 40 °C เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งยาว ทรงกระบอกเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งและมีรูปร่างรีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 แสดงลักษณะเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. Scj 01 (a) ลักษณะเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง
(b) ลักษณะเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว

กรดไขมันที่พบในยีสต์สะสมไขมันอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) หรือไตรเอซิลกลีเซอไรด์ (triacylglyceride) มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-24 อะตอม โดยชนิดที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอม จะพบมากที่สุดซึ่งมีทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว นอกนั้นจะอยู่ในรูปฟอสโฟลิปิด สเตียรอล และเอสเทอร์ของสเตียรอล ไขมันที่พบในยีสต์ส่วนใหญ่จะสมอยู่ในเซลล์เมมเบรน แต่ในยีสต์สะสมไขมันสูงพบว่าอยู่ในรูปหยดไขมัน (fat droplet) หรือหยดน้ำมัน (oil droplet) อยู่ในเซลล์ องค์ประกอบของไขมันในยีสต์สะสมไขมันสูงแสดงในตารางที่ 2.2 ซึ่งจะเห็นว่าไขมันที่ได้จากยีสต์เหล่านี้มีองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายคลึงกับน้ำมันพืช ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 กรดไขมันที่พบในยีสต์สะสมไขมันสูง

สายพันธุ์	ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)							Reference
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	
<i>Torulaporamaleea</i> <i>e</i> Y30		25.69		23.39	45.41	3.41	1.83	Leelsing and Karraphan (2011)
<i>Rhodotorulaglutini</i> <i>s</i>	1.29	18.74		1.16	66.96	4.57		Dai et al. (2007)
<i>Rhodotorulamucila</i> <i>ginosa</i> TJY15a	1.43	21.56	1.96	9.1	54.68	11.27		Zhao et al. (2010)
<i>Lipomycesstarkeyi</i>	0.9	55.93	1.85	13.8	25.89	<0.1	0.12	Angerbauer et al. (2008)
<i>Rhodospodiumtor</i> <i>uloides</i>	0.7	24.3	1.1	7.7	54.6	2.1		Liu and Zhao (2007)
<i>Candida tropicalis</i>	5.3	29.7	5.0	56.2	2.3			Karatay and Dönmez (2010)

ตารางที่ 2.2 กรดไขมันที่พบในยีสต์สะสมไขมันสูง (ต่อ)

สายพันธุ์	ปริมาณไขมัน (ร้อยละ โดยน้ำหนักแห้ง)							Reference
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	
<i>Rhodospiridiumtoruloides</i>	1.3 - 1.5	26.1 - 29.2	0.0 - 1.0	13.0 - 17.8	38.1 - 46.4	9.2 - 10.4	2.6 - 3.8	Xu et al. (2012)

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับไขมันจากพืชน้ำมัน

แหล่งของไขมัน	ร้อยละของกรดไขมันที่พบ									
	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	
<i>Candida 107</i>	2	3	37	1	11	35	8	0	3	
<i>Rhodotorulagracilis</i>	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	

ที่มา: Ratledge (1981)

Gutierrez et al. (1993) ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Saccharomyces Cerevisiae* มีปริมาณกรดไขมันที่ต่างกันถึงแม้จะเลี้ยงในสภาวะที่เหมือนกัน เป็นยีสต์สายพันธุ์เดียวกันแต่มี isolate ต่างกัน ก็ทำให้ปริมาณและองค์ประกอบของไขมันแตกต่างกันไปด้วย ดังตารางที่ 2.4 และ 2.5 จะเห็นได้ว่า *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A พบกรดไขมันชนิดปาล์ม (C16:0) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) มากที่สุด แต่มีปริมาณน้อยกว่าใน *Saccharomyces cerevisiae* Iz-1904

ตารางที่ 2.4 ไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A ที่เจริญในกากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

Fatty acid*	Molasses		
	แหล่งที่ 1	แหล่งที่ 3	แหล่งที่ 9
10:0	1.9	3.0	0.4
10:1	0.2	0.5	0.1
12:0	1.8	3.3	0.7
12:1	0.1	0.1	0.1
14:0	0.7	0.7	0.2
14:1	0.2	0.3	0.2
16:0	29.9	33.5	32.0
16:1	5.3	8.7	2.4

ตารางที่ 2.4 ไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A ที่เจริญใน
กากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (ต่อ)

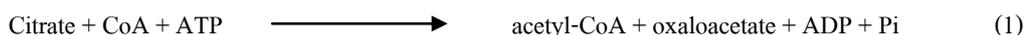
Fatty acid*	Molasses		
	แหล่งที่ 1	แหล่งที่ 3	แหล่งที่ 9
18:0	13.8	14.6	10.2
18:1	8.5	8.4	12.3
18:2	30.7	22.4	34.1
18:3	6.7	4.3	7.4

ตารางที่ 2.5 ไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Iz-1904 ที่เจริญใน
กากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

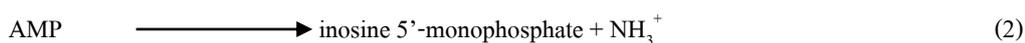
Fatty acid	Molasses		
	แหล่งที่ 1	แหล่งที่ 3	แหล่งที่ 9
10:0	0.7	1.2	0.3
10:1	0.1	0.1	-
12:0	1.4	3.3	1.0
14:0	1.2	1.4	1.1
14:1	0.4	0.4	0.4
16:0	35.3	37.8	34.1
16:1	3.9	7.2	1.8
18:0	9.0	10.3	7.4
18:1	9.7	9.0	12.1
18:2	33.8	24.8	36.0
18:3	4.5	4.4	5.7

2.4 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันภายในเซลล์ยีสต์

จุลินทรีย์ทุกชนิดสามารถสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์เท่านั้นที่สะสมไขมันปริมาณสูงไว้ภายในเซลล์ได้มากกว่า 20% w/w ของน้ำหนักเซลล์ (Ratledge, 1987) กระบวนการชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ยีสต์สะสมไขมันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสหรือสารประกอบอื่นๆ เป็นสารตั้งต้น เราเรียกกระบวนการสังเคราะห์ไขมันนี้ว่าวิถี “De novo” กระบวนการสังเคราะห์ไขมันผ่านวิถี De novo เกิดขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์สะสมไขมัน พบว่ากระบวนการสังเคราะห์ไขมันไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์หลังจากแหล่งไนโตรเจนในอาหารถูกใช้จนหมดไป (Papanikolaou and Aggelis, 2011) โดยจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ไขมันต้องมีคุณสมบัติดังนี้ คือ มีความสามารถในการผลิต acetyl-CoA ได้อย่างต่อเนื่องภายในเซลล์ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันและมีความสามารถในการผลิต NADPH มากเพียงพอเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน การสังเคราะห์ acetyl-CoA ในจุลินทรีย์ไขมันสูงจะเกิดขึ้นเมื่อมีเอนไซม์ ATP: citrate lyase (ACL) (Ratledge, 1981; Ratledge, 2004) ดังสมการที่ (1)

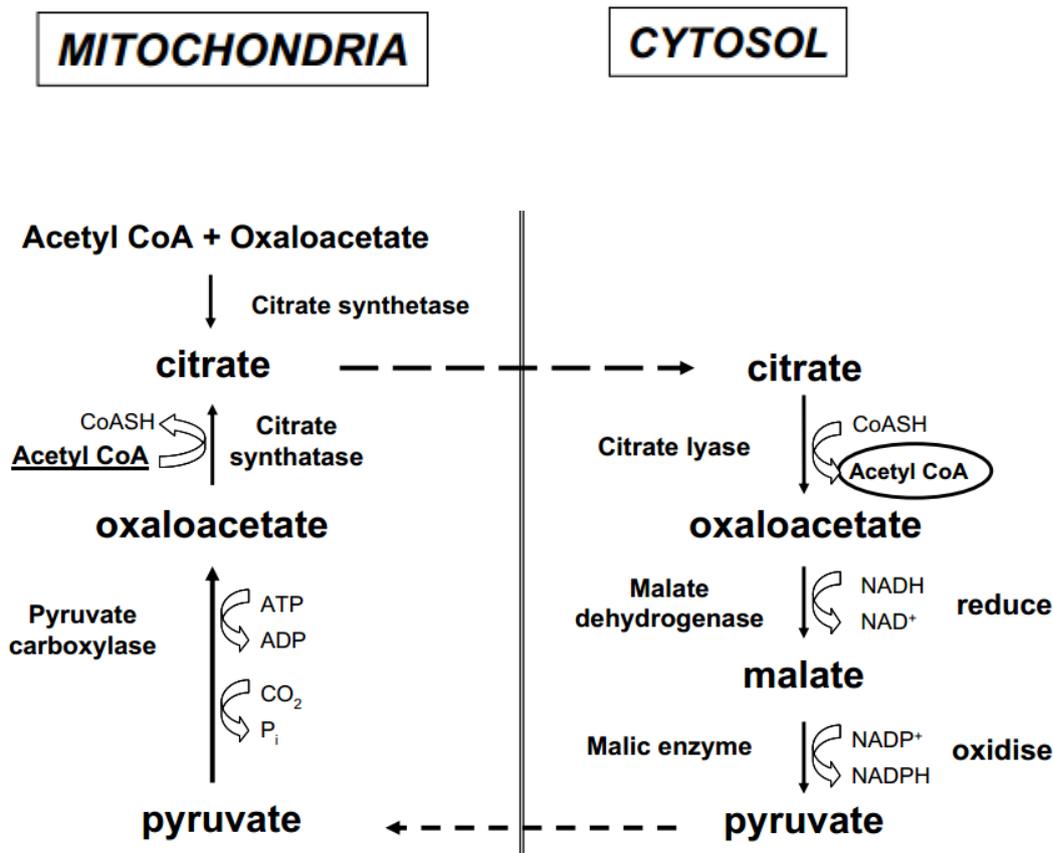


การผลิตไขมันภายในยีสต์ผลิตไขมันสูงจะเกิดขึ้นเมื่อถูกจำกัดปริมาณไนโตรเจนทำให้ AMP ที่อยู่ภายในเซลล์ถูกนำไปใช้และเปลี่ยนเป็นอินโนซีนโมโนฟอสเฟต (IMP) และแอมโมเนียมไอออน (NH_3^+) โดยเอนไซม์ AMP-ดีอะมิเนส (AMP-desaminase) ดังสมการที่ (2) AMP ที่อยู่ภายในเซลล์จึงมีความเข้มข้นต่ำและแอมโมเนียมไอออนจะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสร้างเซลล์หลังจากที่แหล่งไนโตรเจนภายนอกเซลล์ถูกใช้จนหมดไป (Papanikolaou, 2011)



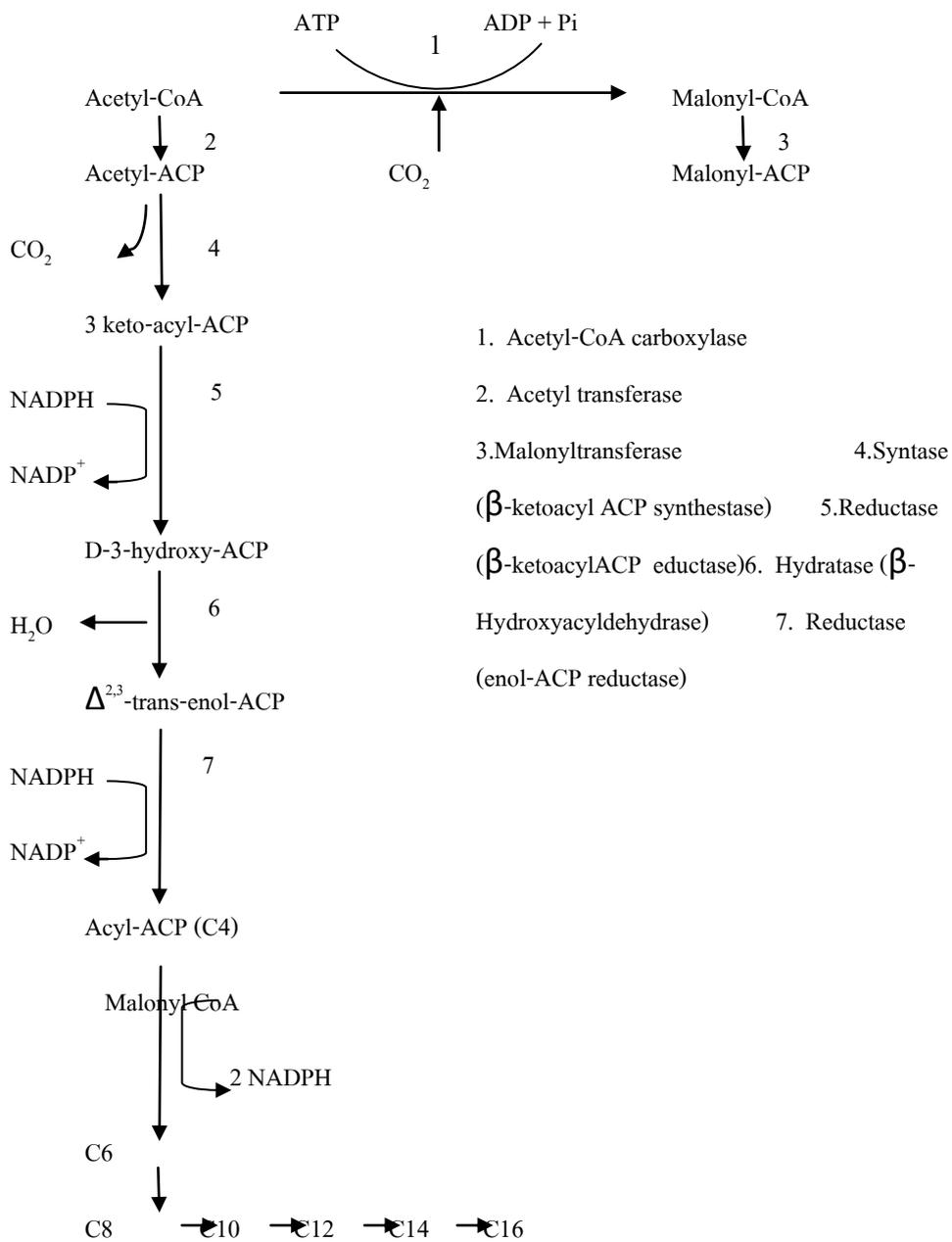
เมื่อความเข้มข้นของ AMP ต่ำทำให้เอนไซม์ NAD (dependent isocitrate dehydrogenase) ซึ่งเมตาบอลิซึมซิเตรทผ่านวัฏจักร ไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle, TCA) ในไมโทคอนเดรียถูกยับยั้งทำให้ isocitrate ถูกสะสมในรูป citrate จากนั้นเอนไซม์ ATP: citrate lyase จะเปลี่ยนซิเตรทไปเป็นอะซิติกโคเอ (acetyl-CoA) ซึ่งต้องอาศัย ATP สูงและออกซาโลอะซิเตรท (oxaloacetate) จะถูกเปลี่ยนเป็นมาเลท (malate) โดยเอนไซม์ malate dehydrogenase จากนั้นจะถูกส่งเข้าไปในไมโทคอนเดรีย เพื่อทำหน้าที่ในการส่งซิเตรทจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาสซึม (Ratledge, 1981)

ในขบวนการสังเคราะห์ไขมันจะเริ่มจากการสังเคราะห์กรดไขมันจาก acetyl-CoA ซึ่งใช้พลังงานจาก ATP และ NADPH จาก pentose phosphate pathway ขบวนการนี้เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึม เริ่มจากการนำเอา acetyl-CoA ที่สังเคราะห์ได้จากวิถีไกลโคลิซิสซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาสซึม ดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7การนำเอา acetyl-CoAจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาสซึมเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน
ที่มา:Ratledge and Evans (1984)

จากนั้นเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในไซโทพลาสซึมเริ่มจากสังเคราะห์กรดพาล์มิติก(C16:0) จากacetyl-CoA ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียจะถูกส่งออกมาที่ไซโทพลาสซึมโดยอาศัย citrate จากนั้นเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในไซโทพลาสซึมโดยการควบคุมของเอนไซม์ fatty acid synthase เริ่มจาก 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 จนได้กรดพาล์มิติก(Ratledge and Evans, 1981; Ratledge, 1991; Ratledge, 2004; Tehlivets et al., 2007) ดังภาพที่ 2.8

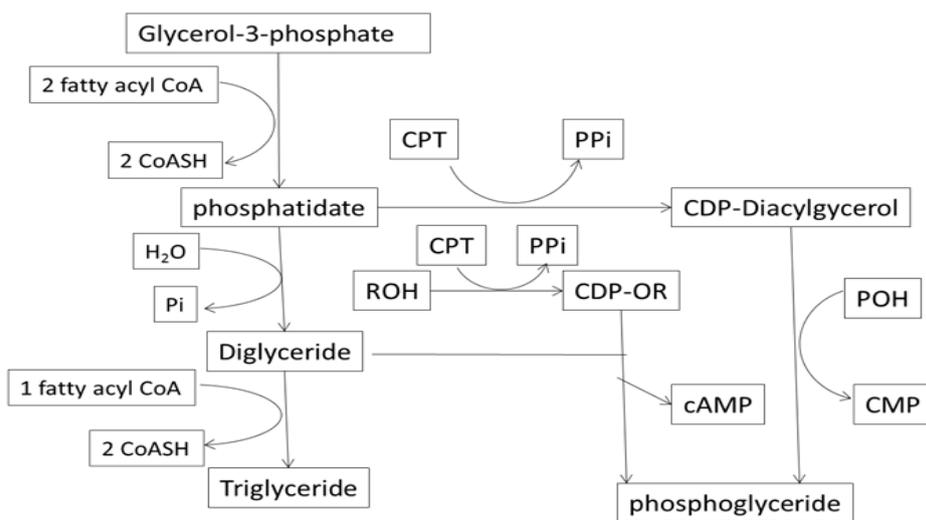


1. Acetyl-CoA carboxylase
2. Acetyl transferase
3. Malonyltransferase
4. Synthase (β -ketoacyl ACP synthetase)
5. Reductase (β -ketoacyl ACP eductase)
6. Hydratase (β -Hydroxyacyldehydrase)
7. Reductase (enol-ACP reductase)

ภาพที่ 2.8 การสังเคราะห์กรดไขมันปาล์มิติกในไซโตรพลาซึม
 ที่มา :ดัดแปลงจาก Ratledge and Evans(1984)

ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่สังเคราะห์กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 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 เรียกกระบวนการนี้ว่า microsomal desaturases 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 (รัตนกรณธ์ ลิลสิงห์, 2551^๑)

กรดไขมันที่สังเคราะห์ได้ในจุลินทรีย์จะเก็บสะสมในรูปของไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์ เนื่องจากกรดไขมันละลายน้ำได้ยากและจะอยู่ในรูปไมเซลล์ (micelle) อีกทั้งคุณสมบัติของความเป็นกรดและเป็น oxidizing agent ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ จึงสร้างพันธะเอสเทอร์กับสารประกอบอื่นๆ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลีเซอรอลได้เป็นกลีเซอไรด์ โดย fatty acyl-CoA รวมตัวกับ glycerol-3-phosphate เกิดเป็น phosphatidate เมื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกไปจะได้กลีเซอไรด์ซึ่งสามารถรวมตัวกับสารอื่น เช่น โคลีน(choline) ซีรีน(serine) และ อินซิทอล(inositol) กลายเป็นฟอสโฟกลีเซอไรด์(phosphoglyceride) แต่การรวมตัวกันนั้น phosphatidate จะถูกเปลี่ยนไปเป็นรูป active form ในรูปอนุพันธ์ของ cytidinediphosphate (CDP) คือ CDP-diacylglycerol แล้วจึงรวมกับสารอื่นๆ ดังภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์
ที่มา:Ratledge and Evans (1984)

2.5 กลไกการควบคุมการเมแทบอลิซึมของไขมันในยีสต์

2.5.1 กลไกควบคุมการสร้างไขมันประกอบด้วย

2.5.1.1 ปริมาณและความสามารถในการเร่งของเอนไซม์ ในขบวนการผลิตกรดไขมันเอนไซม์ต่อไปนี้ อาจช่วยกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์กรดไขมันมากขึ้นได้แก่

- เอนไซม์ pentose phosphate pathway คือ glucose-6-phosphate dehydrogenase และ 6-phosphogluconate dehydrogenase จะเร่งให้กลูโคสเข้าสู่ pentose phosphate pathway มากขึ้นเป็นผลให้มี NADPH ซึ่งใช้ในขบวนการสังเคราะห์กรดไขมันผลิตออกมามากขึ้น

- Acetyl-CoA carboxylase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาจาก Acetyl-CoA เป็น Malonyl CoA ซึ่ง Malonyl CoA นี้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน (Gill and Ratredge, 1973)

- Fatty acid synthetase เป็น complex enzyme ที่เร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์กรดไขมันซึ่งเริ่มจาก Acetyl-CoA ร่วมกับ Malonyl CoA จนถึง Acyl CoA (C4)

ในการควบคุมเมแทบอลิซึมของไขมันโดยเอนไซม์นั้นสามารถควบคุมได้ 2 ลักษณะคือ short term control จะเกี่ยวข้องกับ allosteric regulation และ covalent enzyme modification ซึ่งจะมีผลกับกิจกรรมของเอนไซม์ และอีกลักษณะหนึ่งก็คือ long term regulation ซึ่งพบว่าถ้ามีปริมาณ long chain fatty acid ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ปริมาณของเอนไซม์นี้ลดลงเนื่องจากการลดลงของ mRNA ซึ่งเป็นแม่แบบในการสร้างเอนไซม์

2.5.1.2 Reducing equivalent and activator

- Reducing equivalent ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันคือ NADPH ได้จาก pentose phosphate pathway และ malic enzyme ซึ่งส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์กรดไขมันมากขึ้น (Wynn et al., 2001)

- citrate จะเป็นตัวส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์กรดไขมัน ทั้งนี้เนื่องจากซิเตรทเป็นตัวพาเอา Acetyl-CoA จากไมโทคอนเดรียออกมาสู่ไซโทพลาสซึม (บริเวณที่มีการสังเคราะห์กรดไขมัน) ซึ่งซิเตรทนี้มาจากไพรูเวทของวัฏจักรไกลโคลิซิส โดยซิเตรทจะกระตุ้นการทำงานของ Acetyl-CoA carboxylase ในขบวนการต่อความยาวของคาร์บอนอะตอมของกรดไขมัน

- ATP จะเร่งการสังเคราะห์กรดไขมันโดยเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ Acetyl-CoA carboxylase เช่นกัน

2.5.2 ตัวยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน

ตัวยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันคือ ผลผลิตของกรดไขมัน เช่น free fatty acid และ fatty acid CoA ซึ่งจะยับยั้งแบบย้อนกลับ โดยออกฤทธิ์ที่ Acetyl-CoA carboxylase

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน

การผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญ ปริมาณและองค์ประกอบของไขมันจะประกอบด้วยปัจจัยดังนี้ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ องค์ประกอบของสารอาหาร แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง สภาวะในการเพาะเลี้ยง ปริมาณออกซิเจน ปัจจัยที่กล่าวมานี้ส่งผลต่อการผลิตไขมันในยีสต์สะสมไขมันรวมถึงองค์ประกอบของไขมัน

2.6.1 ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ องค์ประกอบของสารอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปัจจัยเหล่านี้เป็นสิ่งสำคัญในการกำหนดการเจริญเติบโตและการสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมัน โดยยีสต์สะสมไขมันมีความต้องการน้ำตาลหรือสารประกอบอื่นๆ อย่างเพียงพอและมีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่จำกัดเพื่อนำมาใช้สำหรับการเจริญและสะสมไขมัน สารอาหารหลักที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันคือแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ยีสต์สะสมไขมันนอกจากจะใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครสไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้แล้วยังสามารถใช้ชีวมวลอื่นๆ ที่เป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร ในการเจริญเติบโตได้อีกด้วย ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีราคาถูก สามารถลดต้นทุนในการผลิตได้ เช่น กากมันสำปะหลัง กากมันเทศ โมลาส กลีเซอรอล เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่จำกัดแหล่งไนโตรเจนและมีปริมาณของแหล่งคาร์บอนอย่างเพียงพอจะทำให้ยีสต์เริ่มมีการเก็บสะสมไขมันเกิดขึ้น และถ้าต้องการให้ยีสต์สามารถเก็บสะสมไขมันได้สูงจะต้องใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) สูง หากอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำมักจำเป็นเพื่อใช้เพิ่มปริมาณเซลล์ในช่วงแรกของการเจริญ แต่ช่วงหลังการเจริญเป็นการเปลี่ยนคาร์บอนให้เป็นไขมันต้องใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง เพราะฉะนั้นอัตราส่วน C/N จึงส่งผลกระทบต่อศักยภาพในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันเป็นอย่างมาก (Granger et al, 1993; Moreten, 1988) นอกจากนี้จะเห็นว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมนั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์และในสูตรอาหารควรมีการเติมแร่ธาตุที่จำเป็นในปริมาณที่จำกัด เช่น เกลือของโปแตสเซียม แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม และเหล็กเป็นต้น

Chang et al. (n.d.) ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนและอัตราส่วน C/N ที่มีผลต่อการสะสมไขมันและองค์ประกอบของไขมันในยีสต์ *Cryptococcus* sp. โดยใช้กลูโคสและเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าปริมาณไขมันที่สะสมไว้ภายในยีสต์จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอัตราส่วน C/N และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เมื่อใช้อัตราส่วน C/N ระหว่าง 60-90 ความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.2% จะได้ปริมาณไขมันสะสมสูงสุด 60-57% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Fakaset al. (2009) ศึกษาการสะสมไขมันของยีสต์ *Cunninghamella echinulata* และ *Mortierella isabellina* ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส ไซโลสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนในปริมาณจำกัด โดยทำการทดลองกำหนดค่า C/N ratio เริ่มต้นดังนี้คือ 78, 117, 157, 235 และ 285 พบว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 2 ชนิดสามารถใช้น้ำตาลไซโลสสำหรับนำไปสะสมไขมันและสร้างเซลล์ได้มากกว่าแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสและกลีเซอรอล ซึ่ง *Mortierella isabellina* สามารถสะสมไขมันได้สูงสุดเมื่อใช้ C/N ratio เริ่มต้น 285 สะสมไขมันได้ 65.5% ของน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า *Cunninghamella echinulata* สะสมไขมันได้ 57.7% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง อีกทั้งยังกล่าวว่าเชื้อ *Cunninghamella echinulata* และ *Mortierella isabellina* จะใช้แหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญและสร้างเซลล์ภายใน 50 ± 10 ชั่วโมงหลังจากที่เติมเชื้อเริ่มต้นลงไปในอาหาร จากนั้นเซลล์จะนำแหล่งคาร์บอนมาใช้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ มีการสะสมไขมันเกิดขึ้น

พิมลพร ศรีราช(2550) ศึกษาการคัดเลือกยีสต์จากดินและน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันในพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยีสต์ไอโซเลท PSY10 มีการสะสมไขมันสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ที่ pH 5 และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 197.4 และเมื่อเปรียบเทียบการขยายขนาดการ

เพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะ (batch fermentation) ได้ปริมาณไขมันเท่ากับ 44.30% โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบกะป้อน (fed-bath fermentation) ได้ปริมาณไขมันเท่ากับ 59.44% โดยน้ำหนักแห้ง

Zhenget al. (2012) ศึกษาผลของแอมโมเนียต่อการสะสมไขมันของยีสต์ *Cryptococcus curvatus* เลี้ยงในอาหารที่เติมกลูโคส 20 g/l แปรผันปริมาณแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ตั้งแต่ 131-3140 g/l ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น 7.5 เลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นจึงเก็บเกี่ยวเซลล์ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของ NH_4Cl ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ยีสต์และปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์ยีสต์ลดต่ำลง

2.6.2 ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ สภาพในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณออกซิเจนและเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตไขมันทั้งปริมาณและองค์ประกอบของไขมันที่ได้ มีหลายงานวิจัยได้ศึกษาปัจจัยทางกายภาพพบว่าโดยทั่วไปยีสต์ผลิตไขมันจะสามารถผลิตไขมันได้ในสภาพที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กว้าง ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์แต่ละชนิด การเปลี่ยนแปลงค่า pH จะส่งผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมัน อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตจะส่งผลต่อจำนวนคาร์บอนอะตอมและปริมาณความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์ ถ้าอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเพิ่มสูงขึ้นจะทำให้ไขมันที่ได้เป็นไขมันชนิดอิ่มตัว แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำลงไขมันที่ได้จะเป็นไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น โดยปกติยีสต์สะสมไขมันต้องการอากาศในการเจริญและสะสมไขมัน มีหลายงานวิจัยรายงานว่าเมื่อเพิ่มอากาศให้กระบบจะทำให้ปริมาณเซลล์และไขมันสะสมเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตก็ส่งผลต่อการสะสมไขมัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อแต่ละชนิด โดยทั่วไประยะเวลาที่ใช้ในการผลิตจะอยู่ในช่วง 2-5 วัน

Johnson et al. (1992) ได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการสะสมไขมันของเชื้อยีสต์ *Rhodotorulaglutinis* IIP-30 เพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ 30 °C ทำการแปรผันค่า pH 3, 4, 5 และ 6 พบว่าเชื้อยีสต์ *Rhodotorulaglutinis* IIP-30 สามารถผลิตไขมันได้สูงสุด 66% ของน้ำหนักเซลล์ที่ pH 4

Brown and Rose (1969) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนที่มีผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมันของเชื้อยีสต์ *Candida utilis* NCYC 321 ทำการทดลองในช่วงอุณหภูมิ 30-15 °C และทดสอบปริมาณออกซิเจนระหว่าง 75 และน้อยกว่า 1mm Hg พบว่าในสภาพที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงลดลงส่งผลให้มีการสังเคราะห์กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับปริมาณออกซิเจน เมื่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารลดต่ำลงไขมันที่ผลิตได้จะเป็นไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเพิ่มสูงขึ้น

Ruangudomand Punpeng (2011) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสะสมไขมันของเชื้อยีสต์ *Rhodospiridiumtoruloides* TISTR 5123 โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการแปรผันอุณหภูมิตั้งแต่ 10, 15, 20, 25 และ 30 °C พบว่าองค์ประกอบของกรดไขมันส่วนใหญ่ที่ได้จากการสะสมไขมันของยีสต์ที่อุณหภูมิห้องประกอบด้วยกรดปาล์มิติก(43.47%) กรดโอเลอิก(13.79%) และกรดสเตียริก(6.54%) เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Rhodospiridiumtoruloides* TISTR 5123 ที่อุณหภูมิ 10°C พบว่ากรดไขมันส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดปาล์มิติก(29.63%) กรดโอเลอิก (26.84%) และกรดสเตียริก (2.13%) จากการทดลองจึงสรุปได้ว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอุณหภูมิที่ต่ำลงจะทำให้ได้ปริมาณกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเพิ่มสูงขึ้น

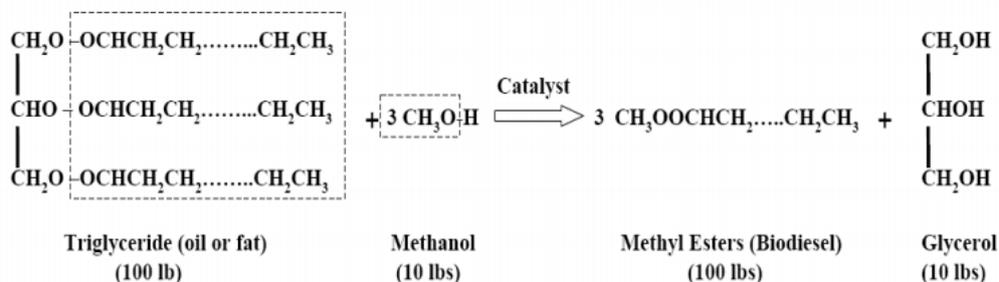
2.7 ไบโอดีเซล

การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลเริ่มมีเมื่อ 100 ปีก่อน ค้นพบโดย Rudolf Diesel ได้คิดค้นเครื่องยนต์ดีเซลและนำเอาน้ำมันพืชมาทดสอบใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับการขับเคลื่อนเครื่องยนต์ดีเซล และหลังจากนั้นในช่วงปี 1930-1940 มีการนำน้ำมันไบโอดีเซลมาใช้ แต่ใช้ในสถานการณ์ฉุกเฉินเท่านั้น จนกระทั่งเมื่อไม่นานมานี้โลกได้ประสบกับปัญหาภาวะขาดแคลนน้ำมัน เนื่องจากมีน้ำมันอยู่อย่างจำกัดส่งผลให้น้ำมันดิบมีราคาแพง น้ำมันพืชและไขมันสัตว์จึงได้รับความสนใจในการนำมาผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซลใช้ทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่บรรยากาศเป็นสาเหตุของการเกิดปัญหาภาวะโลกร้อน (Ma and Hanna, 1999)

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่งและเป็นพลังงานจากธรรมชาติที่สามารถผลิตได้จากพืชหรือสัตว์ไบโอดีเซลมีความหมายหลายประการสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท (อนุชา พรหมวังขวา และ ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร, 2550)คือ

1. น้ำมันพืชโดยตรง เริ่มใช้เมื่อประมาณ ค.ศ.1900 โดย Rudolf Diesel ได้คิดเครื่องยนต์ดีเซลและใช้น้ำมันจากถั่วลิสง ซึ่งปัจจุบันมีการใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นเชื้อเพลิงโดยตรง โดยนิยมใช้ในเครื่องยนต์ทางการเกษตรที่มีความเร็วรอบเครื่องยนต์ต่ำ
2. น้ำมันพืชผสมกับน้ำมันดีเซล โดยใส่สารตัวเติมลงไปเพื่อให้ น้ำมันทั้ง 2 ชนิดเข้ากันได้ อย่างไรก็ตามถ้าใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์ผสมลงในน้ำมันดีเซลจะผสมได้ไม่เกินร้อยละ 5
3. น้ำมันพืชที่นำมาทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน ซึ่งเป็นการลดขนาดโมเลกุลของน้ำมันพืชลงเพื่อเปลี่ยนน้ำมันพืชเป็นไบโอดีเซล

การผลิตไบโอดีเซลเกิดขึ้นโดยผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีหรือเรียกว่าการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน(Transesterification) ดังภาพที่ 2.10 ระหว่างน้ำมันหรือไขมันที่ได้จากพืช (เช่น ดอกทานตะวัน ถั่วเหลือง ดอกคาโนลา) ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้วทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ โดยส่วนใหญ่ใช้เมทานอลและมีเบสแก่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และสุดท้ายได้กลีเซอรอลดิบเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Pyle, 2008)



ภาพที่ 2.10 การผลิตไบโอดีเซลโดยผ่านปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน
ที่มา: Pyle (2008)

2.7.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

1. การเตรียมน้ำมันก่อนทำปฏิกิริยาวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตจะถูกเตรียมให้เหมาะสมก่อนเข้าทำปฏิกิริยา หากเป็นน้ำมันปาล์มดิบจำเป็นต้องผ่านกระบวนการแยกขางเหนียว และลดกรดให้มีปริมาณกรดไขมันอิสระต่ำกว่าร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ส่วนวัตถุดิบจากน้ำมันพืชที่ผ่านการใช้แล้วจะถูกนำมากรองแล้วจึงนำไปขจัดน้ำออก

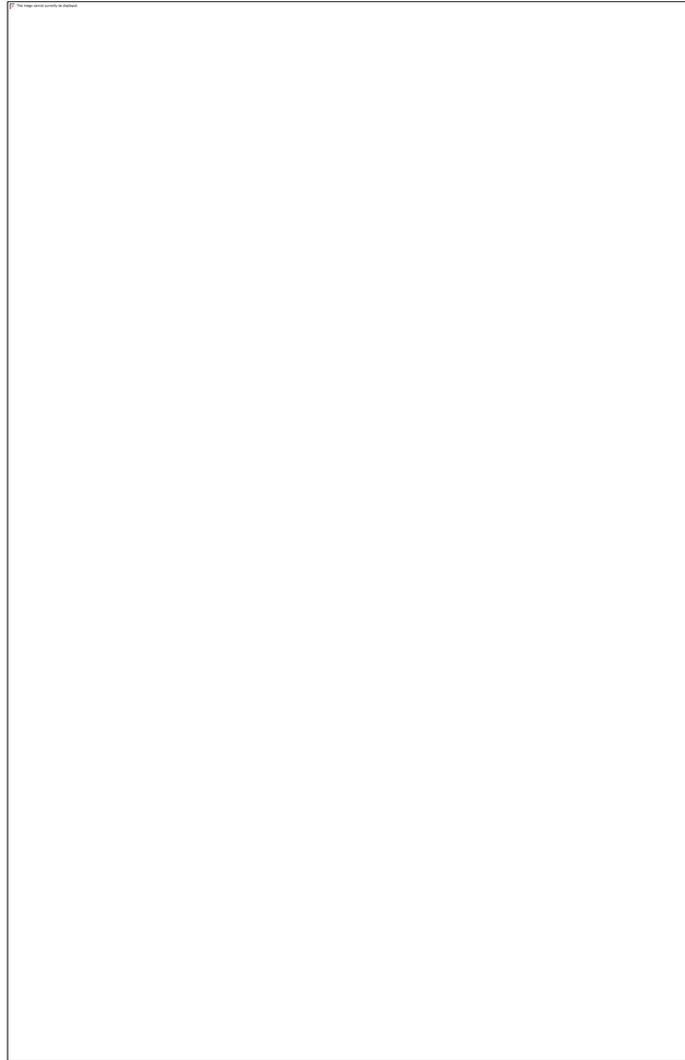
2. การเตรียมสารละลายแอลกอฮอล์ หรือการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยใช้เมทานอลที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งถูกเลือกใช้เพราะมีราคาถูก โดยเมทานอลต้องไม่มีน้ำเจือปนเกินกว่า 1% การเตรียมสารละลายกระทำโดยการนำโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.5 - 5 ส่วน ละลายในเมทานอล 100 ส่วน โดยน้ำหนัก ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เตรียมเป็นไปตามปริมาณกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในวัตถุดิบ หากกรดไขมันอิสระมีปริมาณสูงโซเดียมไฮดรอกไซด์ก็จะใช้ในสัดส่วนที่สูงขึ้น

3. การทำปฏิกิริยาน้ำมันที่ถูกขจัดน้ำแล้วถูกทำให้มีอุณหภูมิประมาณ 80 °C จากนั้นจึงเติมสารละลายแอลกอฮอล์ลงไปอย่างช้าๆ (เติมให้หมดภายใน 10 นาที) สัดส่วนน้ำมันต่อสารละลายแอลกอฮอล์โดยน้ำหนักเท่ากับ 5 ต่อ 1 ทำการกวนเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างทั่วถึงเป็นเวลาประมาณ 15 นาที ด้วยอัตราการกวนปานกลาง (500 รอบ/นาที) อุณหภูมิในช่วงนี้ลดลงเหลือประมาณ 65 °C การเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ได้เมทิลเอสเทอร์และกลีเซอรอล แต่ปฏิกิริยานี้ผันกลับได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหยุดกวนเพื่อแยกผลผลิตตัวใดตัวหนึ่งออกเมื่อหยุดกวนกลีเซอรอลซึ่งมีความหนาแน่นสูงกว่า (ประมาณ 1.26 กรัม/มิลลิลิตร) จะแยกชั้นออกจากชั้นเมทิลเอสเทอร์ โดยแยกตัวตกลงมาที่ก้นถัง ดังนั้นในชั้นเมทิลเอสเทอร์จะเหลือกลีเซอรอลอยู่น้อย ปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเอสเทอร์จะสามารถดำเนินต่อไปอย่างช้าๆ เมื่อทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง น้ำมันก็จะทำปฏิกิริยาไปมากกว่า 95%

4. การแยกกลีเซอรอลกลีเซอรอลจะถูกถ่ายออกไปสู่ภาชนะ โดยการถ่ายออกทางด้านล่างของถังปฏิกรณ์ ในขณะที่ยังร้อนอยู่เพราะหากทิ้งไว้ให้เย็น ชั้นกลีเซอรอลจะกลายเป็นของแข็ง

5. การล้างสิ่งปนเปื้อนออกเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ยังปนเปื้อนด้วยสารอื่นๆ เช่น สบู่ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไขมันอิสระหรือน้ำมัน กลีเซอรอลที่ละลายอยู่ในชั้นเมทิลเอสเทอร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เมทานอลที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาและน้ำมันที่ทำปฏิกิริยาไม่หมด ดังนั้นจึงต้องทำการขจัดออกด้วยการล้างด้วยน้ำอุ่นหลายๆครั้ง ปริมาณน้ำที่ใช้แต่ละครั้งประมาณ 1 ต่อ 4 ของปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เมื่อเติมน้ำเพียงพอแล้วรอให้น้ำแยกชั้นจากเมทิลเอสเทอร์เป็นเวลาพอสมควร (ประมาณ 5 - 10 นาที) ก็ถ่ายน้ำออกด้านล่าง เติมน้ำอุ่นเพื่อล้างใหม่ การล้างจะกระทำ 4 - 5 ครั้ง และเพิ่มการกวนในการล้างครั้งหลังๆ

6. การขจัดน้ำออกขั้นสุดท้ายเมื่อล้างสิ่งปนเปื้อนออกหมดแล้ว ขั้นตอนสุดท้ายคือการขจัดน้ำที่หลงเหลือในชั้นเมทิลเอสเทอร์ออก ซึ่งกระทำโดยการให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาที หรือการกรองด้วย salt filter และเมื่อทิ้งไว้ให้เย็นก็สามารถนำไปเก็บเพื่อใช้งานต่อไป (ชาคริต ทองอุไรและคณะ, 2545)แสดงดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 ขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล

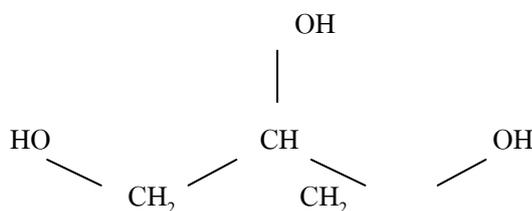
สมาคมการค้าไบโอดีเซลระหว่างประเทศในสหรัฐอเมริกา มีโครงการผลิตไบโอดีเซลจาก 100 แกลลอน ในปี 2005 เพิ่มขึ้นเป็น 450 ล้านแกลลอน ในปี 2007 ในขณะที่เดียวกันส่งผลให้ปริมาณกลีเซอรอลดิบสั้นตลาด จึงทำให้ราคากลีเซอรอลดิบตกลงจาก 25 เซนต์/ปอนด์ ในปี 2004 เหลือเพียง 2.5-5 เซนต์/ปอนด์ ในปี 2006 (Johnson and Taconi, 2007) ความต้องการที่จะนำกลีเซอรอลดิบไปใช้ประโยชน์มีไม่มากพอจึงเกิดปัญหาเกี่ยวกับการจัดการหรือการกำจัดกลีเซอรอลดิบ ซึ่งหากยังไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์หรือการจัดการที่ดีแล้ว อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยรวมในอนาคต

การยอมรับไบโอดีเซลจากน้ำมันจากจุลินทรีย์ของผู้บริโภค ไบโอดีเซลจากน้ำมันจากจุลินทรีย์จะต้องมีมาตรฐานเดียวกับไบโอดีเซลที่ผลิตจากแหล่งอื่นๆ สำหรับมาตรฐานของไบโอดีเซลแบ่งเป็น 2 มาตรฐานคือ มาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกา ASTM D6751 และมาตรฐานของยุโรป EN14214 มาตรฐานทั้งสองมีค่าที่แตกต่างกัน แต่สำหรับการนำไบโอดีเซลไปใช้ในทางการค้านั้นจะมีอยู่ 2 ลักษณะคือ การใช้ไบโอดีเซลผสมกับ

น้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่างๆ และการใช้ไบโอดีเซลแทนน้ำมันดีเซล ไบโอดีเซลที่ใช้ในทางการค้ามีอยู่หลายชนิดโดยใช้สัญลักษณ์ B หมายถึง ไบโอดีเซล ส่วนตัวเลขที่ต่อท้ายคือ สัดส่วนของน้ำมันไบโอดีเซลที่มีการผสมลงไปน้ำมันดีเซล ได้แก่ B5, B20 และ B100 ตัวอย่างเช่น ไบโอดีเซล B5 หมายถึง การผสมไบโอดีเซลกับน้ำมันดีเซลให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยมีไบโอดีเซล 5 % ส่วนที่เหลืออีก 95 % เป็นน้ำมันดีเซล ไบโอดีเซล B20 มีการใช้งานในประเทศในทวีปยุโรป ได้แก่ประเทศเยอรมัน (Ozsezen et al., 2008) สำหรับประเทศไทยการกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลถูกกำหนดโดยกรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน โดยมีมาตรฐาน 3 ฉบับด้วยกันคือ มาตรฐานไบโอดีเซล B100 มาตรฐานไบโอดีเซล B5 สำหรับขายเชิงพาณิชย์และมาตรฐาน B100 สำหรับไบโอดีเซลชุมชน B100 ถูกกำหนดให้เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันคือต้องทำจากเมทานอลที่มีข้อกำหนด 23 รายการ เช่น ร้อยละของเมทิลเอสเทอร์ความหนืดที่อุณหภูมิมาตรฐาน อุณหภูมิจุดวาบไฟค่าสมบัติการป้องกันการน็อกของเครื่องยนต์และปริมาณร้อยละของน้ำ ส่วนไบโอดีเซล B5 มีข้อกำหนดเหมือนน้ำมันดีเซลทุกประการ ยกเว้นสีของน้ำมันที่เป็นสีน้ำเงิน ส่วนไบโอดีเซล B100 สำหรับคุณภาพของไบโอดีเซลชุมชนนั้น มีสมบัติใกล้เคียงกับไบโอดีเซล B100 แต่มีข้อกำหนดเพียง 12 รายการและน้ำมันต้องมีสีม่วง (อนุชาพรมวัง ขวาและชัยชาญฤทธิเกริกไกร, 2550)

2.8 กลีเซอรอล (Glycerol) วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

กลีเซอรอล (1,2,3- propanetriol หรือ 1,2,3-trihydroxy propane) เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลีเซอริน (glycerine หรือ glycerin) กลีเซอรอลเป็นสารประกอบโพลีออลอย่างง่าย มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ชอบน้ำ 3 หมู่ซึ่งตอบสนองต่อความสามารถในการละลายน้ำ และความสามารถดูดความชื้น แกนหลักของกลีเซอรอล (the glycerol backbone) เป็นศูนย์กลางของไขมันทุกชนิด เช่น ไตรกลีเซอไรด์ มีสูตรโมเลกุลคือ $C_3H_5(OH)_3$ และสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.12 (สุขใจ ชูจันทร์, 2555) กลีเซอรอลมีคุณสมบัติทางกายภาพเป็นของเหลวใส คล้ายน้ำมัน ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีความหนืดสูง สามารถละลายในน้ำและในเอทานอลได้ดี (Perry and Green, 1997) คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอลบริสุทธิ์แสดงในตารางที่ 2.6



ภาพที่ 2.12 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Myers (2007)

ตารางที่ 2.6 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอลบริสุทธิ์

สูตรเคมี	$C_3H_8O_3$
น้ำหนักโมเลกุล	$92.09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
ความหนาแน่น (ที่อุณหภูมิ 20 °C)	$1.261 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
ค่าพลังงาน	$18 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$
จุดหลอมเหลว	$18.0 \text{ }^\circ\text{C}$
จุดเดือด (ที่ 101.9 kPa)	$290.0 \text{ }^\circ\text{C}$
ค่าการนำไฟฟ้า(ที่อุณหภูมิ 20 °C)	$0.1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

ที่มา: ดัดแปลงจาก Christoph et al. (2006)

ปัจจุบันมีการนำกลีเซอรอลบริสุทธิ์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น และนอกจากนี้สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้ได้โดยตรง เนื่องจากกลีเซอรอลเป็นสารเคมีพื้นฐานที่สามารถนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบอื่นๆ ที่มีมูลค่าสูง โดยการทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน รีดักชันหรือปฏิกิริยาการรวมกันของกลีเซอรอลกับสาร โมเลกุลอื่น (Johnson and Taconi, 2007)

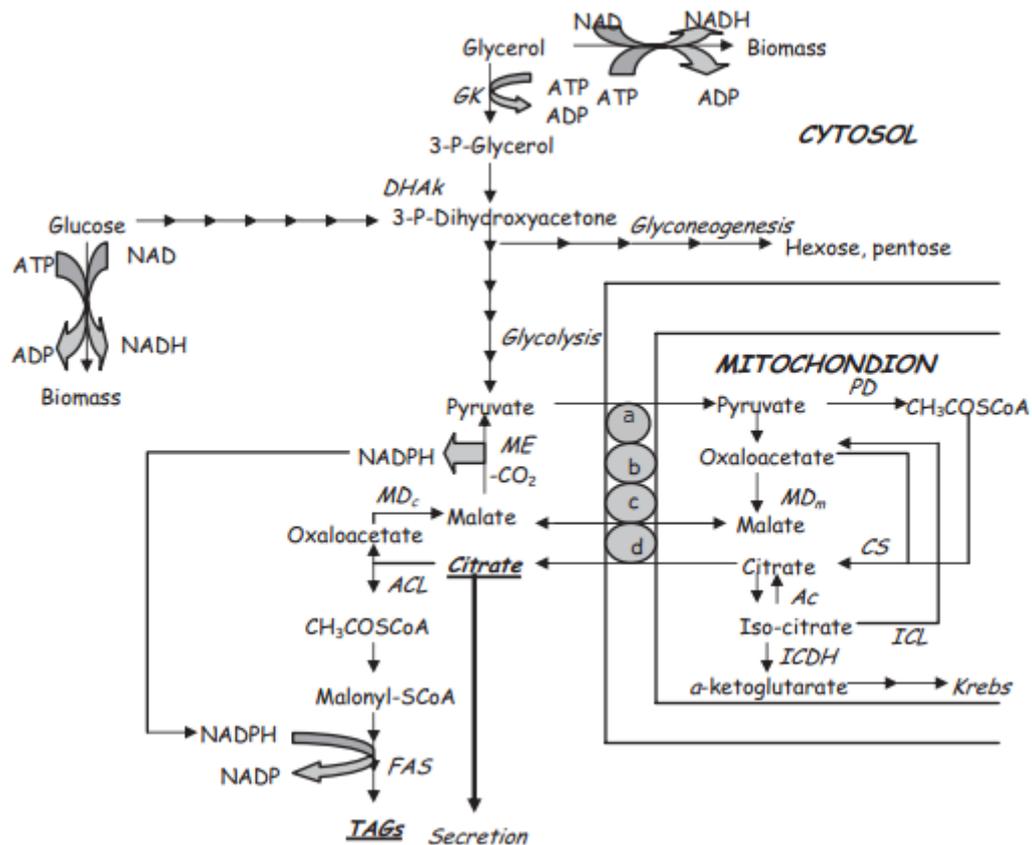
2.8.1 กลีเซอรอลดิบ

กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จัดเป็นของเสียที่มีมูลค่าน้อยในระบบเศรษฐกิจการผลิตไบโอดีเซลประกอบไปด้วยเมทานอลและส่วนที่เป็นสบู่ ผู้ผลิตใช้เมทานอลในการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันและไม่สามารถดึงเมทานอลออกมาได้ทั้งหมด จึงทำให้มีชั้นของกลีเซอรอลเกิดขึ้น อีกทั้งกรดไขมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตไบโอดีเซลเมื่อทำปฏิกิริยากับเบสจะเกิดเป็นสบู่ที่ละลายอยู่ในชั้นของกลีเซอรอล กลีเซอรอลจึงประกอบไปด้วยธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ เป็นต้น (Thompson and He, 2006)

Thompson and He (2006) ได้ศึกษาองค์ประกอบของแร่ธาตุในกลีเซอรอลดิบที่ได้จากแหล่งวัตถุดิบต่างๆ ในการนำไปผลิตไบโอดีเซล (เช่น เมล็ดคัสตาร์ด คาโนลา ถั่วเหลือง น้ำมันพืชที่ใช้แล้ว) พบว่าส่วนประกอบในกลีเซอรอลที่ได้มาจากแหล่งต่างๆ มีความคล้ายคลึงกัน ประกอบไปด้วยแคลเซียม 10-20 ppm แมกนีเซียม 3-7 ppm ฟอสฟอรัส 10-60 ppm และซัลเฟอร์ 14-21 ppm ซึ่งความเข้มข้นของแร่ธาตุที่พบในกลีเซอรอลแตกต่างจากการรายงานของ Schröder and Südekum (1999) รายงานว่าองค์ประกอบของแร่ธาตุในกลีเซอรอลดิบที่ได้จากเมล็ดเรปส์ประกอบด้วยฟอสฟอรัส 1.05-2.36% ของกลีเซอรอลดิบ โปแตสเซียม 2.2-2.33% โซเดียม 0.09-0.11% แคลเซียม เมอร์คิวรี และอาร์ซีนิกไม่สามารถตรวจวัดได้ เนื่องจากมีปริมาณต่ำมาก

2.8.2 เมทาบอลิซึมของยีสต์ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

กลีเซอรอลเป็นโมเลกุลขนาดเล็กไม่มีประจุสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ เมื่อกลีเซอรอลผ่านเข้าไปภายในเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอล-3-ฟอสเฟต ด้วยเอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส และกลีเซอรอล-3-ฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็น 3-P-Dihydroxyacetone (Silva et al., 2009) ดังภาพที่ 2.13 และเข้าสู่วัฏจักรไกลโคลิซิสเกิดการสังเคราะห์ไขมันดังได้อธิบายมาแล้วในหัวข้อที่ 2.4



(a-c) ระบบการขนส่งไพรูเวตจากไซโตพลาสซึมเข้าสู่ไมโทคอนเดรียและการขนส่งมาเลทในทิศทางตรงกันข้าม
(d) ระบบการขนส่งซิเตรทและมาเลทระหว่างไซโตพลาสซึมและไมโทคอนเดรีย เอนไซม์

Ac; acotinase

ICDH; isocitrate dehydrogenase

ACC; acetyl-CoA carboxylase

MD_c; malate dehydrogenase (cytoplasmic)

ACL; ATP-citratelase

MD_m; malate dehydrogenase (mitochondrial)

FAS; fatty acid synthetase,

PD; pyruvate dehydrogenase

PFK; phosphofruktokinase

PK; pyruvate kinase

ภาพที่ 2.13 การสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์ไขมันสูงเมื่อมีกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น

ที่มา: Papanikolaou and Aggelis (2011)

Xu et al. (2012) ได้ศึกษาการผลิตไขมันของยีสต์ *Rhodospidiumtoruloides* โดยใช้กลีเซอรอลดิบ A (มีกลีเซอรอล 85.19%) และ B (มีกลีเซอรอล 32.97%) ปริมาตร 60 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้น เพราะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรอาหาร 4 ลิตร รอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที ควบคุมความเป็นกรดต่างที่ pH 6 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาทั้งหมด 5-6 วัน กลีเซอรอลดิบ A และ B สามารถผลิตไขมันได้ 18.5 และ 13.4 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์ได้ 26.7 และ 18.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จะพบว่า *Rhodospidiumtoruloides* มีศักยภาพในการผลิตไขมันโดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นสารตั้งต้นดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7เปรียบเทียบการผลิตไขมันของยีสต์ *Rhodospidiumtoruloides* กับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆในอาหารที่เติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณ เซลล์ (g/l)	ไขมัน สุทธิ (%)	ปริมาณไขมัน (g/l)	การเพาะเลี้ยง
<i>Cunninghamellaechinulata</i>	กลูโคส	15	46	6.9	Batch in flask
<i>Thraustochytrium</i> sp.	กลูโคส	23.9	30.1	7.2	Batch in flask
<i>Rhodospidiumtoruloides</i>	กลูโคส	18.2	76.1	13.9	Batch in flask
<i>Mortierellaisabellina</i>	กลีเซอรอลดิบ	8.5	51	4.4	Batch in fermenter
<i>Cryptococcus curvatus</i>	กลีเซอรอลดิบ	32.9	52.9	18	Fed-batch in fermenter
<i>Yarrowialipolytica</i>	กลีเซอรอลดิบ	8.1	43	3.5	Continuous in fermenter
<i>Rhodospidiumtoruloides</i>	กลูโคส	16.7	66.9	11.2	Batch in
	กลีเซอรอลบริ	18.8	58.7	11.0	fermenter
	สุทธิ	26.7	69.5	18.5	Batch in
	กลีเซอรอลดิบ A	18.0	74.1	13.4	fermenter
	กลีเซอรอลดิบ B				Batch in fermenter Batch in fermenter

Amarettiet al. (2012) ทดสอบความสามารถในการเจริญและการผลิตไขมันของจุลินทรีย์สะสมไขมันทั้งหมด 40 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหาร GMY ที่เติมกลีเซอรอล 4% พบว่ามี 3 สายพันธุ์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลหมดภายใน 120 ชั่วโมงและมีการสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์ ได้แก่ *Candida freyschussii*, *Pichiafarinose* และ *Saccharomyces spencerorum* ซึ่ง *C.freyschussii* สามารถสะสมไขมันได้สูงสุดถึง 33% ของน้ำหนักเซลล์แห้งและมีปริมาณเซลล์สูงสุดจากเชื้อทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ดังนั้นจึงได้นำเชื้อ *C.freyschussii* ไปทำการศึกษาต่อโดยเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกันระหว่างการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) และการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Fed-batch fermentation) พบว่าการหมักแบบไม่ต่อเนื่องสามารถผลิตไขมันโดยใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นสูงสุดคือ 40 กรัมต่อลิตร ผลิตไขมันได้ 4.7 กรัมต่อลิตร ความสามารถในการผลิต (Productivity) คือ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงกว่า 40 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญของเซลล์ถูกยับยั้งและทำให้ช่วงการสะสมไขมันเดือนออกไป ซึ่งแตกต่างจากระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง การหมักในระบบนี้สามารถ

สะสมไขมันได้สูงถึง 29 กรัมต่อลิตร (32% ของน้ำหนักเซลล์) ภายใน 100 ชั่วโมง ความสามารถในการผลิตไขมันคือ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Xu et al. (2012) ศึกษาการสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมันสูง *Rhodospiridium toruloides* โดยใช้ กลิเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักแบบกะ (Batch fermentation) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาณอาหาร 4 ลิตร ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตรควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ pH6 การละลายของออกซิเจน (Dissolved oxygen) 20-30% และมีการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที พบว่า *Rhodospiridium toruloides* สามารถเจริญได้ดีที่สุดในแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลีเซอรอล มีปริมาณเซลล์สูงสุดคือ 26.7 กรัมต่อลิตรผลิตไขมันได้สูงสุด 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง