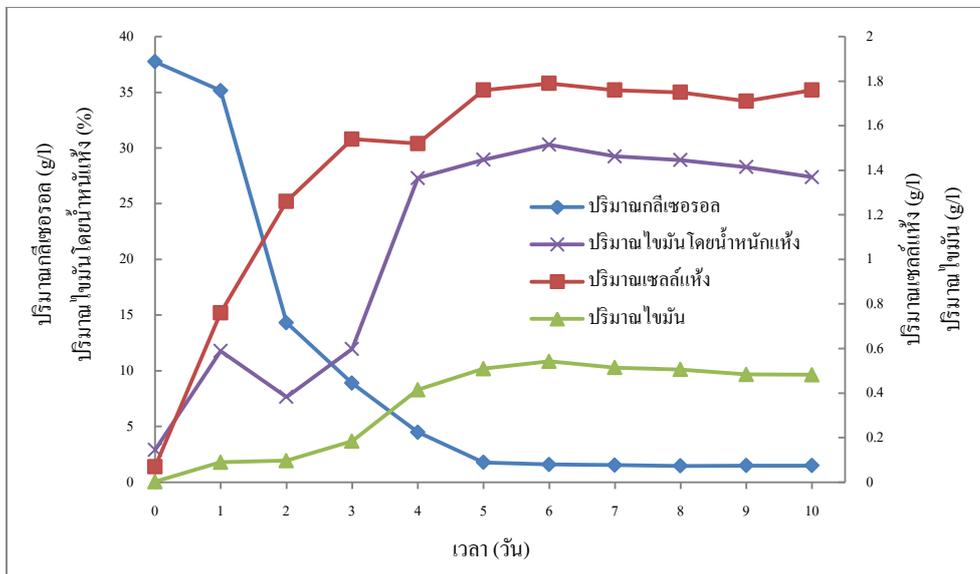


## บทที่ 4

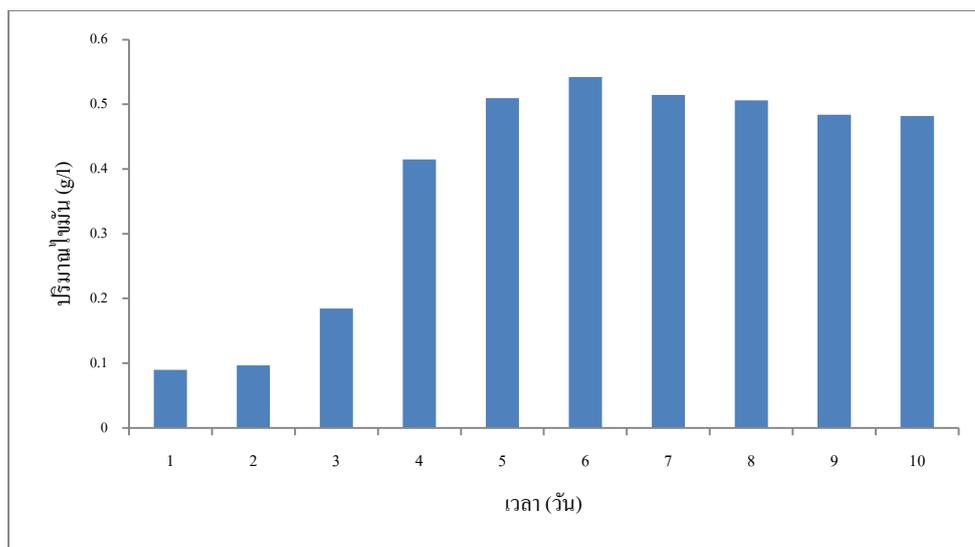
### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไขมัน

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia sp. Scj 01* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ที่มีกลีเซอรอล 40 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เชื้อตั้งต้น (inoculum size) 5% pH เริ่มต้น 4 บ่มแบบเขย่าในตู้บ่มที่ความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 10 วัน ผลการศึกษาดังภาพที่ 4.1 และ 4.2



ภาพที่ 4.1 แสดงการเจริญในรูปปริมาณกลีเซอรอล (g/l) ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักรวม (%) ปริมาณเซลล์แห้ง (g/l) ปริมาณไขมัน (g/l) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ที่มีกลีเซอรอล 40 (g/l) ที่ 40 °C เป็นเวลา 10 วัน



ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณไขมันภายในเซลล์ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ที่มีกลีเซอรอล 40 (g/l)

จากรูปที่ 4.1 เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 ในอาหารที่มีกลีเซอรอล 40 กรัม/ลิตร บ่มแบบเขย่าในตู้บ่มที่มีความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 10 วัน พบว่าการเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามปริมาณการใช้กลีเซอรอล ในช่วง 3 วันแรกของการหมัก ปริมาณไขมันที่ได้ยังมีปริมาณต่ำเนื่องจากเป็นช่วงเริ่มต้นของการเจริญ โดยเซลล์จะนำเอาแหล่งไนโตรเจนไปใช้เพื่อการเจริญและสร้างเซลล์ในช่วงแรกแต่หลังจากที่แหล่งไนโตรเจนถูกใช้จนหมดไป เซลล์จะดึงเอาแหล่งคาร์บอนมาใช้และสะสมไขมันในรูปแบบของไตรกลีเซอไรด์ภายในเซลล์ (Hammond and Glatz, 1988) และตั้งแต่วันที่ 4 ของการหมักเป็นต้นไป ยีสต์เข้าสู่การเจริญในช่วงสุดท้ายของระยะ exponential phase หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase ปริมาณไขมันเริ่มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ และค่อยๆ คงที่ในวันที่ 6 โดยปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดคือ 1.79 กรัม/ลิตร ปริมาณไขมันสูงสุดคือ 0.54 กรัม/ลิตร หรือ 30.29% โดยน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 6 ของการหมัก จากผลการศึกษาจึงเลือกระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 วัน ซึ่งเซลล์ยีสต์มีการเจริญและสะสมไขมันสูงสุด ดังภาพที่ 4.2 เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

#### 4.2 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันที่ทนร้อนโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติ (Statistical method)

ในการดำเนินการจำเป็นต้องมีการวางแผนไว้ล่วงหน้า เพื่อให้บรรลุความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ การวางแผนที่ดีจะช่วยทำให้เกิดปัญหาระหว่างการทดลองลดน้อยลง เมื่อทดลองแล้ว ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์และได้คำตอบตามความมุ่งหมายที่ต้องการศึกษา ดังนั้นการออกแบบการทดลองจึงหมายถึงกระบวนการที่ใช้ในการวางแผนการดำเนินการวิจัยที่มีระบบ และมีขั้นตอนเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่ต้องการนำมาใช้ในการตอบปัญหาการวิจัยตามจุดประสงค์หรือสมมุติฐานของการวิจัยที่กำหนดไว้ได้อย่างถูกต้อง ชัดเจน รวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือ ที่

เปรียบเทียบแผนผังผิวของผิวของผิวผู้วิจัยในการกำหนดโครงสร้าง แผนการปฏิบัติการวิจัยหรือยุทธวิธีเพื่อใช้ในการตรวจสอบการดำเนินการวิจัยว่าเป็นไปตามเวลาที่กำหนดไว้

การออกแบบการทดลองในงานวิจัยนี้เพื่อต้องการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งมีการออกแบบโดยการหาพื้นที่การตอบสนอง (Response surface design) เพื่อประเมินความเหมาะสมในสภาวะการทดลอง และอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับค่าการตอบสนอง โดยการวิเคราะห์ที่ได้ถูกนำมาใช้เพื่อค้นหาค่าตอบของการทดลองที่ประกอบด้วยปัจจัยร่วมการทดลองหลายปัจจัย ซึ่งจะสามารถนำไปสู่การค้นพบการตอบสนองที่ดีที่สุดหรือเหมาะสมที่สุด โดยการตอบสนองที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะคือการตอบสนองที่มากที่สุด (maximum) และการตอบสนองที่น้อยที่สุด (minimum) ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของการทดลอง ซึ่งมีการออกแบบการทดลองทางสถิติดังนี้

#### 4.2.1 การคัดเลือกปัจจัยสำหรับการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์สะสมไขมัน *Pichiasp.Scj* 01 โดยวิธี Plackettburman

การออกแบบการทดลอง Plackettburman เป็นการคัดกรองและคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อระบบ ซึ่งถูกนำมาใช้ในช่วงต้นๆ ของการศึกษา ในงานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมไขมันของยีสต์สะสมไขมัน *Pichiasp.Scj* 01 เป็นวิธีที่สามารถลดจำนวนปัจจัยจำนวนมากๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อระบบการทดลองจริงๆ โดยในการทดลองนี้ได้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองทั้งหมด 5 ปัจจัยและกำหนดระดับของค่าปัจจัยสำหรับการวัดผลกระทบของแต่ละปัจจัยโดยกำหนดระดับของปัจจัย 2 ค่าด้วยกันคือ ค่าต่ำ (-1) ค่าสูง (+1) ของแต่ละปัจจัยแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงระดับและปัจจัยที่ใช้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน

*Pichiasp.Scj* 01 โดยวิธี Plackettburman

รหัส	ปัจจัย	ค่าต่ำ (-1)	ค่าสูง (+1)
A	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	1	5
B	ปริมาณกลีเซอรอล(เปอร์เซ็นต์)	4	10
C	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	40	44
D	ความเป็นกรด-ด่าง	4	6
E	ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบ/นาที)	100	200

จากการศึกษาค้นคว้าหลายงานวิจัยเพื่อระบุปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 ให้สามารถผลิตไขมันได้สูงสุด จึงได้กำหนดปัจจัยด้วยกันทั้งหมด 5 ปัจจัย และมีการกำหนดระดับของแต่ละปัจจัย โดยการตั้งสมมุติฐานของการทดลองที่รวบรวมได้จากกรารายงานในงานวิจัยอื่นๆ มาพิจารณา ร่วมกันจากการรวบรวมข้อมูลและพิจารณาปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพ พบว่าปัจจัยหลักที่ทำให้ยีสต์เจริญได้ดีและสะสมไขมันได้มากอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยดังนี้ อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตจะมีผลต่อจำนวนคาร์บอนอะตอมและปริมาณความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์ อุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ประมาณ 24-40 °C สำหรับ

ในช่วงอุณหภูมินี้ถ้าอุณหภูมิสูงจะทำให้มีการผลิตไขมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัว แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำจะมีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว Granger et al. (1992)พบว่าเมื่อเลี้ยง *Rhodotorulaglutinis* NRRLY1091 ที่อุณหภูมิต่ำจะผลิตกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง ทั้งนี้เนื่องจาก desaturation enzyme และ elongation enzyme มีความไวต่ออุณหภูมิ

งานวิจัยนี้จึงได้นำเอาปัจจัยเหล่านี้มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไขมันของยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 เพื่อให้ได้ปริมาณสูงสุด โดยวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติโดยปัจจัยทั้ง 5 ที่นำมาออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackettburmanจะประกอบไปด้วยระดับของแต่ละปัจจัย 2 ระดับ คือ ค่าต่ำ (-1) และค่าสูง (+1) ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ดังตารางที่ 4.2 หลังจากออกแบบการทดลองเรียบร้อยแล้วจะได้จำนวนการทดลองทั้งหมด 12 การทดลอง (Run) ตามการออกแบบการทดลองของ Expert design version 7 ซึ่งแต่ละการทดลองจะมีระดับของแต่ละปัจจัยที่แตกต่างกัน โดยแต่ละการทดลองจะเลี้ยงในอาหารสูตร Production medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนในปริมาณเล็กน้อยและมีการแปรผันปริมาณกลีเซอรอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ระยะเวลาในการหมัก 6 วัน ซึ่งได้ผลของปริมาณไขมันของแต่ละการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยโปรแกรม Expert design โดยวิธี Plackettburman สำหรับคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน *Pichiasp.Scj* 01

Run	Experimental values					lipid content (g/l)
	A	B	C	D	E	
1	+1	-1	-1	-1	+1	0.358
2	+1	-1	+1	+1	+1	0
3	+1	+1	+1	-1	-1	0
4	+1	-1	+1	+1	-1	0
5	-1	-1	+1	-1	+1	0
6	-1	+1	+1	+1	-1	0
7	-1	-1	-1	+1	-1	0.468
8	+1	+1	-1	-1	-1	0.406
9	-1	+1	+1	-1	+1	0
10	-1	-1	-1	-1	-1	0.389
11	-1	+1	-1	+1	+1	0.509
12	+1	+1	-1	+1	+1	0.265

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ตัวแปรทางสถิติ (ANOVA) เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์

ตะสมไขมัน *Pichiasp.Scj* 01 โดยวิธี Plackettburman

Code	Variable	Low level(-1)	High level(+1)	Coefficient	F-value	p-value Prob>F
A	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	1	5	-0.02808	2.27224	0.1824
B	ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์)	4	10	-0.00292	0.02451	0.8807
C	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	40	44	-0.19958	114.76411	< 0.0001
D	ความเป็นกรด-ด่าง	4	6	0.00742	0.15848	0.7043
E	ความเร็วรอบในการ เขย่า (รอบ/นาที)	100	200	-0.01092	0.34335	0.5793

จากการวิเคราะห์ตัวแปรทางสถิติ (ANOVA) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์ตะสมไขมัน *Pichiasp.Scj* 01 โดยวิธี Plackettburman เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมและมีผลที่ดีที่สุดในการผลิตไขมันของยีสต์ตะสมไขมัน ซึ่งค่าที่ใช้ในการตอบสนองคือ ปริมาณไขมัน (กรัม/ลิตร) โดยการพิจารณาจากปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันแล้วให้ปริมาณไขมัน ซึ่งพิจารณาจากค่า  $p$ -value ควรมีค่าน้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่าให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการออกแบบการทดลองต้นแบบ (Model) ให้ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.0007 จึงสามารถสรุปได้ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาในการออกแบบการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถนำไปใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันได้สูงสุดของยีสต์ตะสมไขมัน *Pichiasp.Scj* 01 ได้ใช้ในการออกแบบการทดลองขั้นตอนต่อไปโดยสามารถสรุปแนวโน้มของปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองได้จากค่าการออกแบบการทดลองของแต่ละปัจจัยที่เป็น ค่าต่ำ (-1) และ ค่าสูง (+1) สรุปได้ดังนี้ปัจจัย C อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) มีค่า  $p$ -value ที่ได้จากการออกแบบการทดลองเท่ากับ < 0.0001 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าอุณหภูมิมีผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่อปริมาณไขมัน (Lipid content) ดังนั้นในการศึกษาลำดับต่อไป อุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยที่ต้องนำมาแปรผันหาช่วงที่เหมาะสมเพื่อการผลิตไขมันให้ได้ปริมาณมากที่สุดส่วนปัจจัยอื่นได้แก่ ปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์), ปัจจัย B ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์), ปัจจัย D ความเป็นกรด-ด่าง และ ปัจจัย E ความเร็วรอบในการเขย่า ให้ค่า  $p$ -value มากกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าระดับของปัจจัยทั้ง 4 มิผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหมายความว่า ค่าระดับปัจจัยที่กำหนดทั้งค่าต่ำ (-1) และค่าสูง (+1) ของแต่ละปัจจัยสามารถให้ผลิตภัณฑ์หรือปริมาณไขมันที่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามในขณะที่ปัจจัย A ค่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) ยังให้ค่า  $p$ -value ต่ำอยู่ ดังนั้นจึงควรนำไปศึกษาต่อในการออกแบบการทดลองในขั้นตอนต่อไปในการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไขมันจากยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 และจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการออกแบบการทดลองแบบ Plackettburman ยังสามารถบอกถึงแนวโน้มค่าระดับของแต่ละปัจจัยที่ควรนำไปใช้ในการทดลองต่อไปว่าควรนำค่าต่ำ (-1) หรือค่าสูง (+1) ไปแปรผันในขั้นตอนต่อไปของการทดลองเพื่อ

ออกแบบการทดลองให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) ที่บ่งบอกว่าควรรนำค่าต่ำ (-1) หรือค่าสูง (+1) ไปใช้ในการแปรผันระดับของปัจจัยเพื่อให้ได้ค่าที่ใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสมในการผลิตไขมันพบว่าปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) มีค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ -0.02808 ซึ่งมีค่าติดลบแสดงว่าค่าที่เหมาะสมในการแปรผันสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป คือ ระดับค่าต่ำ (-1) ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์เมื่อมีการใช้ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นก็ไม่ทำให้การสะสมไขมันเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วยปัจจัย B ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์) มีค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ -0.00292 ค่าที่ดีที่สุดก่อนมาทางด้านระดับต่ำ คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ Amaretti et al. (2012) รายงานว่ายีสต์สะสมไขมัน *Candida Freyschussii* สามารถผลิตไขมันได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัม/ลิตร และจะถูกยับยั้งการเจริญเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลมากกว่า 40 กรัม/ลิตร หรือ 4% อีกทั้งทำให้ยีสต์สะสมไขมันใช้ระยะเวลาในการผลิตไขมันนานขึ้น ปัจจัย D ความเป็นกรด-ด่างมีค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ 0.00742 ค่าที่เหมาะสมคือ ระดับค่าสูง ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 ซึ่งความเหมาะสมของความเป็นกรด-ด่างจะมีความเหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง ปัจจัย E ความเร็วรอบในการเขย่ามีค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ -0.01092 ค่าที่เหมาะสมคือ ระดับค่าต่ำ ที่ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบ/นาที แต่อย่างไรก็ตามการทดลองในขั้นตอนนี้ เป็นเพียงการถ่วงน้ำหนักปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองเท่านั้น โดยค่าเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นการพิจารณาเพื่อใช้ในการทดลองหาค่าที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันเพื่อให้ได้ปริมาณไขมันสูงสุดในการทดลองต่อไป

#### 4.2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน *Pichiasp.Scj 01* โดยวิธี Central Composite Design (CCD)

การออกแบบ Central Composite Design (CCD) เป็นอีกวิธีหนึ่งในการหาพื้นผิวตอบสนองที่นิยมใช้เพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสม ผลลัพธ์ของการออกแบบมีการหมุนเพื่อถูกใช้ในการประมาณสัมประสิทธิ์ของพื้นที่การตอบสนองที่เป็นเส้นโค้ง (Response Surface Design) เพื่อประเมินหาความเหมาะสมในสภาวะของการทดลอง ซึ่งการออกแบบ Central Composite Design ต้องการ 5 ระดับของแต่ละปัจจัยที่ต้องการศึกษา เป็นการออกแบบที่เพิ่มความละเอียดหรือทำให้เข้าใกล้ความเหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ต้องการศึกษามากขึ้น โดยระดับเหล่านี้จะใช้สัญลักษณ์เป็นระดับต่ำมาก ( $-\alpha$ ) ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) ระดับสูง (+1) และระดับสูงมาก ( $+\alpha$ ) ซึ่งค่าเหล่านี้จะถูกกำหนดและอ้างอิงมาจากการออกแบบการคัดเลือกและถ่วงน้ำหนักปัจจัยจากการออกแบบ Plackettburman

งานวิจัยนี้เพื่อต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pichiasp.Scj 01* โดยออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design มีการกำหนดระดับปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองทั้งหมด 4 ปัจจัย ซึ่งปัจจัยที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้างต้นด้วยวิธี Plackettburman ประกอบด้วย ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์), ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์) และอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ปัจจัยที่นำมาพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการออกแบบการทดลองด้วย Plackettburman โดยสามารถพิจารณาแนวโน้มค่าการแปรผันจากค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) ซึ่งค่าที่แปรผันจะครอบคลุมค่าแนวโน้มที่ควรเป็นไปได้จากการพิจารณาข้างต้น

#### ตารางที่ 4.4 แสดงระดับและปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Central Composite Design (CCD)

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไขมันของยีสต์ *Pichiasp.Scj 01*

รหัส	ปัจจัย	ค่าต่ำมาก(-)	ค่าต่ำ (-1)	ค่ากลาง (0)	ค่าสูง (+1)	ค่าสูงมาก
------	--------	--------------	-------------	-------------	-------------	-----------

		$\alpha$				$(+\alpha)$
A	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	0	0.5	1	1.5	2
B	ความเป็นกรด-ด่าง	4	5	6	7	8
C	ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์)	0	2	4	6	8
D	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	34	37	40	43	46

หมายเหตุ: เพาะเลี้ยงในอาหาร Production medium ในตู้บ่มแบบเขย่าความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 6 วัน การแปรผันปัจจัยทั้ง 4 ปัจจัยดังแสดงในตารางที่ 4.4 สามารถพิจารณาได้จากค่า Coefficient ที่ได้จากผล

การวิเคราะห์ในการออกแบบการทดลอง Plackettburman โดยค่าที่ได้ที่เหมาะสมที่ทำให้ยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 สามารถสะสมไขมันได้สูงสุดคือ ปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อออกแบบการทดลองด้วยวิธี Central Composite Design ในโปรแกรม Expert design version 7 สามารถออกแบบการทดลองได้โดยมีจำนวนการทดลองทั้งหมด 30 การทดลอง (Run) ดังตารางที่ 4.5 ซึ่งแต่ละการทดลองจะนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาจุดที่เหมาะสมของการผลิตไขมันจากเชื้อยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01

ตารางที่ 4.5 การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วย Central Composite Design (CCD) ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01

Run	Variable/levels				Lipid conten (g/l)
	Inoculum (%)	Initial pH	Glycerol (%)	Temperature (°C)	

	Actual	Code	Actual	Code	Actual	Code	Actual	Code	
1	1	0	6	0	4	0	40	0	0.86
2	1.5	+1	7	+1	2	-1	43	+1	0.23
3	1	0	6	0	4	0	46	+ $\alpha$	0
4	0.5	-1	5	-1	2	-1	43	+1	0.33
5	1.5	+1	7	+1	6	+1	37	-1	0.49
6	1	0	6	0	8	+ $\alpha$	40	0	0.65
7	0	- $\alpha$	6	0	4	0	40	0	0
8	1.5	+1	5	-1	6	+1	43	+1	0.81
9	1	0	8	+ $\alpha$	4	0	40	0	0.89
10	1	0	4	- $\alpha$	4	0	40	0	1.08
11	0.5	-1	7	+1	2	-1	37	-1	0.34
12	0.5	-1	5	-1	2	-1	37	-1	0.51
13	0.5	-1	5	-1	6	+1	37	-1	0.33
14	1	0	6	0	4	0	34	- $\alpha$	0.28
15	0.5	-1	5	-1	6	+1	43	+1	0.73
16	0.5	-1	7	+1	6	+1	37	-1	0.6
17	1.5	+1	7	+1	2	-1	37	-1	0.43
18	1	0	6	0	4	0	40	0	0.94
19	1	0	6	0	4	0	40	0	1.08
20	1	0	6	0	4	0	40	0	0.96
21	1.5	+1	5	-1	2	-1	43	+1	0.65
22	0.5	-1	7	+1	6	+1	43	+1	0.72
23	1.5	+1	7	+1	6	+1	43	+1	0.69
24	0.5	-1	7	+1	2	-1	43	+1	0.46
25	1.5	+1	5	-1	6	+1	37	-1	0.67
26	2	+ $\alpha$	6	0	4	0	40	0	1.12
27	1	0	6	0	4	0	40	0	1.02

ตารางที่ 4.5 การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วย Central Composite Design (CCD) ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ *Pichia* sp. Scj 01 (ต่อ)

Run	Variable/levels				Lipid conten
	Inoculum (%)	Initial pH	Glycerol (%)	Temperature (°C)	

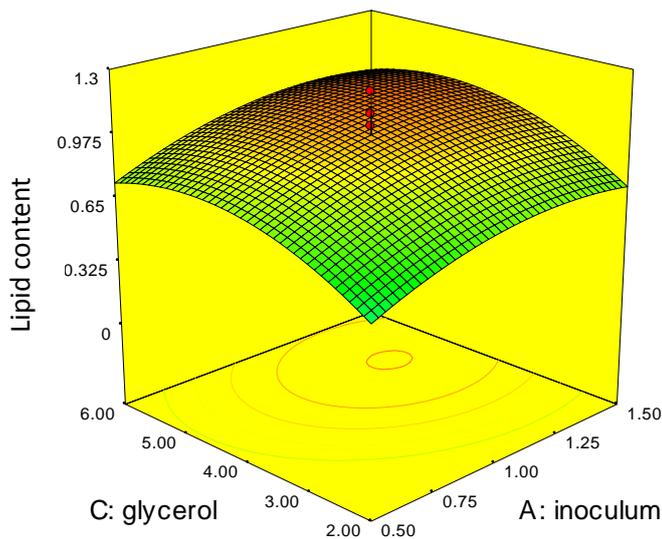
	Actual	Code	Actual	Code	Actual	Code	Actual	Code	(g/l)
28	1	0	6	0	4	0	40	0	1.19
29	1.5	+1	5	-1	2	-1	37	-1	0.49
30	1	0	6	0	0	<b>-<math>\alpha</math></b>	40	0	0

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ANOVA) ของการออกแบบการทดลองด้วย Central Composite Design (CCD) ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ *Pichiasp.Scj 01*

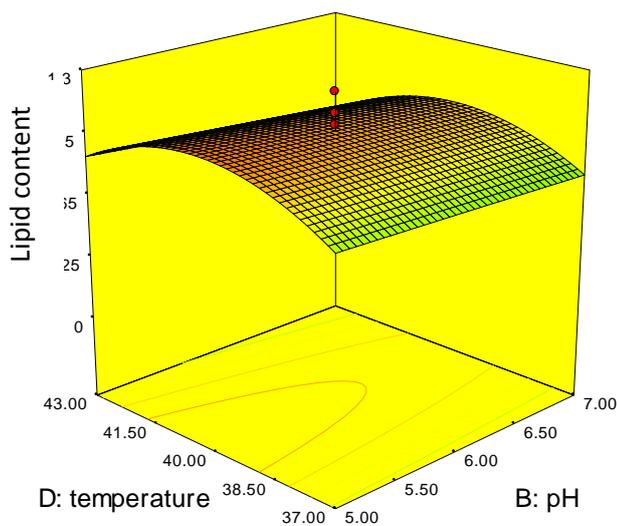
Source	Sum of squares	df	Mean squares	F-value	p-value Prop>F
Model	2.768867	14	0.197776	5.110056	0.0017
A-inoculum	0.299267	1	0.299267	7.732323	0.014
B-pH	0.036817	1	0.036817	0.951253	0.3449
C-glycerol	0.350417	1	0.350417	9.053914	0.0088
D-temperature	0.001667	1	0.001667	0.043063	0.8384
AB	0.0625	1	0.0625	1.614848	0.2232
AC	0.0009	1	0.0009	0.023254	0.8808
AD	0.0016	1	0.0016	0.04134	0.8416
BC	0.0144	1	0.0144	0.372061	0.551
BD	0.0049	1	0.0049	0.126604	0.7269
CD	0.0576	1	0.0576	1.488244	0.2413
A <sup>2</sup>	0.316971	1	0.316971	8.189771	0.0119
B <sup>2</sup>	4.29E-05	1	4.29E-05	0.001107	0.9739
C <sup>2</sup>	0.7581	1	0.7581	19.58746	0.0005
D <sup>2</sup>	1.238571	1	1.238571	32.00167	< 0.0001
Residual	0.58055	15	0.038703		
Lack of Fit	0.513267	10	0.051327	3.814218	0.0763
Pure Error	0.067283	5	0.013457		

จากตารางการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Central Composite Design การทดลองให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.0017 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 การออกแบบการทดลองนี้จึงสามารถนำมาใช้และค้นหาคำตอบของค่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยในการทดลองนี้ได้ (จากตารางที่ 4.6) และพบว่าจากทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันของยีสต์ *Pichiasp.Scj 01* สามารถผลิตไขมันได้สูงสุดคือ 1.19 กรัม/ลิตร หรือ 40.88 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งจากการทดลองนี้เลี้ยงในสภาวะที่มี

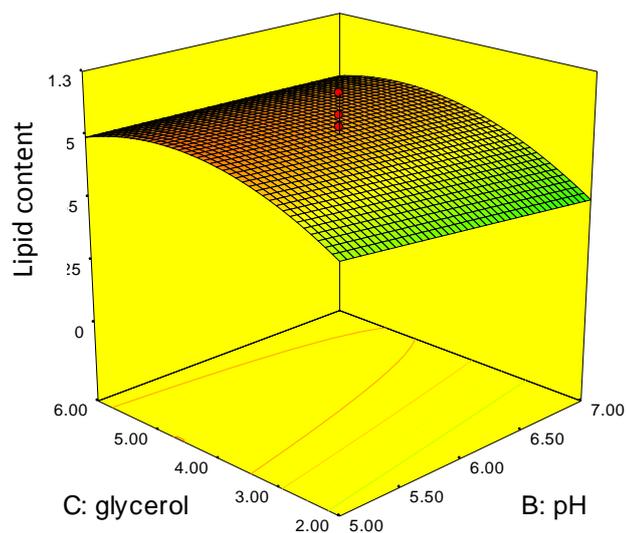
กลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลาทั้งหมด 6 วัน โดยสภาวะข้างต้นเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถทำให้ยีสต์ *Pichia sp. Scj 01* สามารถผลิตและสะสมไขมันได้สูงสุด ดังแสดงในภาพที่ 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 และ 4.8



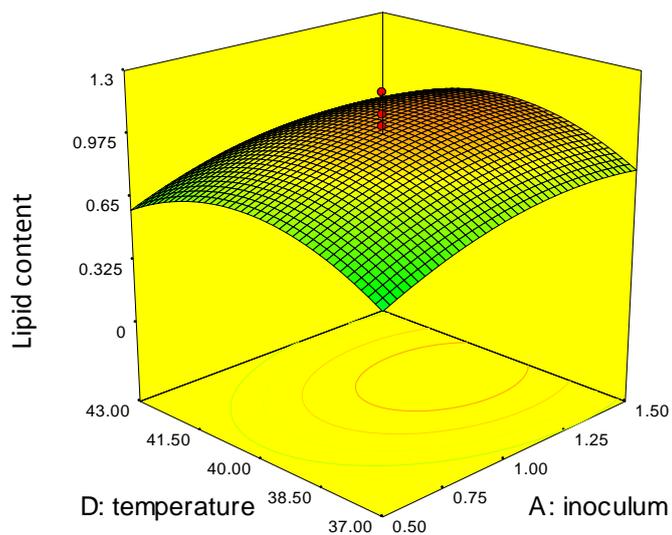
ภาพที่ 4.3 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย C ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์) กับ ปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) บนค่าที่เหมาะสมของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6 และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



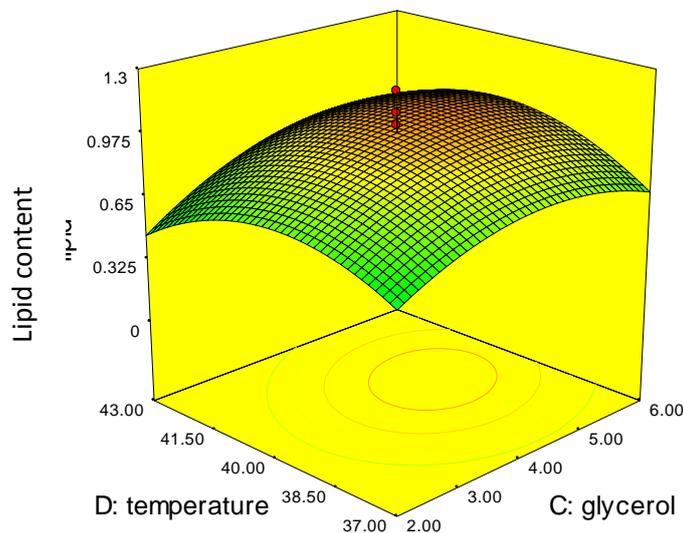
ภาพที่ 4.4 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย D อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) กับ ปัจจัย B ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) บนค่าที่เหมาะสมของปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์และปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์



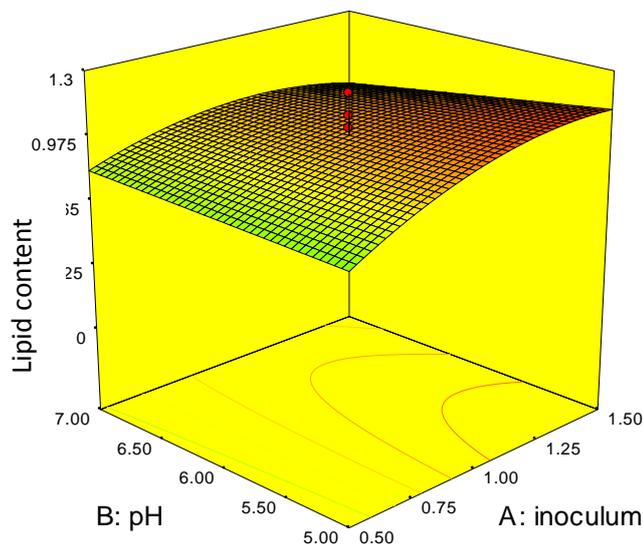
ภาพที่ 4.5 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย C ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์) กับ ปัจจัย B ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) บนค่าที่เหมาะสมของปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.6 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย D อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) กับ ปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) บนค่าที่เหมาะสมของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6 และ ปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.7 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย D อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) กับ ปัจจัย C ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์) บนค่าที่เหมาะสมของเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6



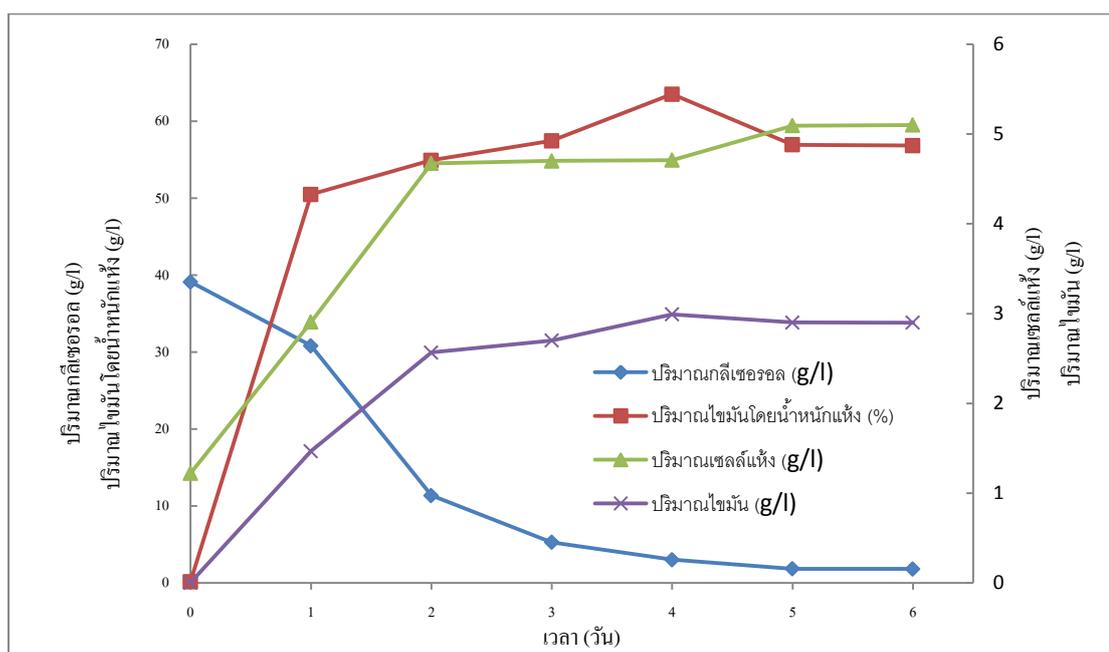
ภาพที่ 4.8 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย B ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับ ปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) บนค่าที่เหมาะสมของปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์และที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากกราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ ที่แสดงในภาพที่ 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 และ 4.8 เป็นการแสดงอิทธิพลร่วมของแต่ละปัจจัยและสามารถบ่งบอกหรือทำนายให้ทราบถึงปริมาณไขมัน (Lipid content) ที่เชื้อ *Pichiasp.Scj* 01 สามารถผลิตได้ โดยแสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมีผลต่อกัน จากกราฟสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงบนพื้นที่ผิวที่ตอบสนองของกราฟที่มีอิทธิพลต่อกันเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงปฏิบัติได้ ซึ่งจะสามารถหาค่าการตอบสนองที่เหมาะสมที่สุดและจากรายงานการวิจัยต่างๆ สามารถสรุปได้ว่าการผลิตและสะสมไขมันของยีสต์จะสามารถผลิตไขมันให้ได้มากที่สุดขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี ดังนั้นจากการทดลองหาสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมนี้สามารถทำนายและนำไปใช้ในเชิงปฏิบัติที่มีระดับการผลิตขนาดใหญ่ขึ้นได้

#### 4.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 ในสภาวะที่เหมาะสมในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

จากการออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยวิธี Central Composite Design ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อหาสภาวะในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 ให้สามารถผลิตและสะสมไขมันให้ได้มากที่สุด โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองคือ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6 และปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร Production medium ที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนประกอบด้วย yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 กรัม/ลิตร,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัม/ลิตร และ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 กรัม/ลิตรทำการเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 100 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 6 วัน สภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าวนี้ได้นำไปศึกษาต่อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 ลิตร สภาวะที่ใช้มีดังนี้คือ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6 ปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบ/นาที และเพิ่มอัตราการให้อากาศเข้าไปในกระบวนการหมักที่ 1 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที (vvm) ตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งคาดว่า การเติมอากาศให้กับยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักจะสามารถทำให้ปริมาณการเจริญของยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ปริมาณเซลล์มากขึ้นและสามารถทำให้ได้การสะสมของไขมันภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย โดยจะทำการเก็บตัวอย่างทุก 1 วัน เพื่อติดตามผลการทดลองดังภาพที่ 4.9 พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดีและสะสมไขมันได้สูงสุดคือ 2.99 กรัม/ลิตร หรือ 63.52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งและมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 4.71 กรัม/ลิตรซึ่งในทางทฤษฎีการใช้น้ำตาลเฮกโซสหรือกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถผลิตไขมันได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Rossi et al., 2011) ในวันที่ 4 ของการหมัก จากกราฟจะเห็นได้ว่าในช่วง 2 วันแรกของการหมักยีสต์ *Pichiasp.Scj* 01 มีการเจริญอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องมาจากการใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อนำไปสร้างเซลล์ ในขณะที่เดียวกันการผลิตไขมันมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ มีรายงานว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนจะส่งผลต่อการเหนี่ยวนำการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันเป็นอย่างมาก (Granger et al., 1993; Ratledge and Wynn, 2002) โดยช่วงแรกของการเจริญเซลล์จะนำเอาไนโตรเจนไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน กรดนิวคลีอิก และในขณะเดียวกันแหล่งคาร์บอนจะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสร้างคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีนและกรดนิวคลีอิกเช่นกัน ถ้าหากสภาวะในการเพาะเลี้ยงมีปริมาณไนโตรเจนอย่างจำกัดจะทำให้อัตราการเจริญค่อยๆ ช้าลงและการ

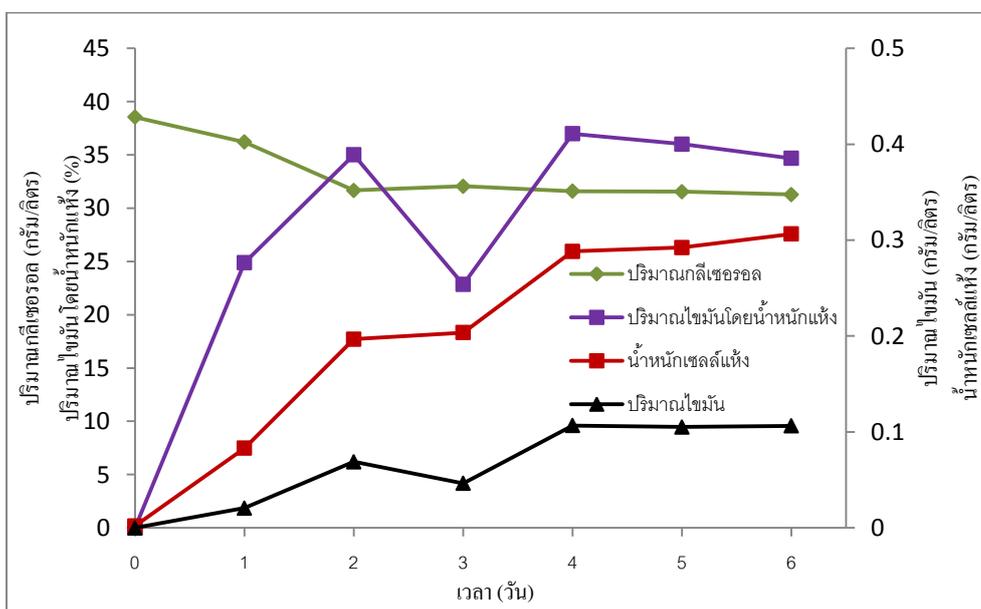
สังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิกก็จะสิ้นสุดลงไปด้วย ในกรณีที่ไมไซยีสต์สะสมไขมันแหล่งคาร์บอนจะถูกเก็บไว้ภายในเซลล์ ไม่มีการนำมาใช้หรือถูกเปลี่ยนไปเป็นไขมัน ในทางตรงกันข้าม ยีสต์สะสมไขมันจะนำเอาแหล่งคาร์บอนไปสังเคราะห์ไขมันเป็นไตรเอซิลกลีเซอไรด์และเก็บไว้ในเซลล์ (Ratledge and Wynn, 2002; Granger et al., 1993) หลังจากวันที่ 4 ของการหมักพบว่าปริมาณไขมันเริ่มคงที่และมีแนวโน้มที่จะลดลงอาจเป็นเพราะปริมาณกลีเซอรอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญเหลืออยู่ในระบบน้อย ปริมาณกลีเซอรอลที่เหลืออยู่ในวันสุดท้ายของการหมักคือ 1.81 กรัม/ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของปิยวรรณ บัวใหญ่ (2555) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ทนร้อน *Pichiasp.Scj 01* ในอาหาร Production medium ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน โดยใช้น้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิคซ์เริ่มต้น 100 กรัม/ลิตรค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร และเพิ่มอัตราการให้อากาศเข้าไปในกระบวนการหมักที่ 1 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที สามารถผลิตไขมันได้สูงสุดคือ 3.11 กรัม/ลิตร หรือ 60.98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเชื้อ *Pichiasp. Scj 01* มีศักยภาพเพียงพอในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้เท่าเทียมเท่ากับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ สำหรับการผลิตไขมัน



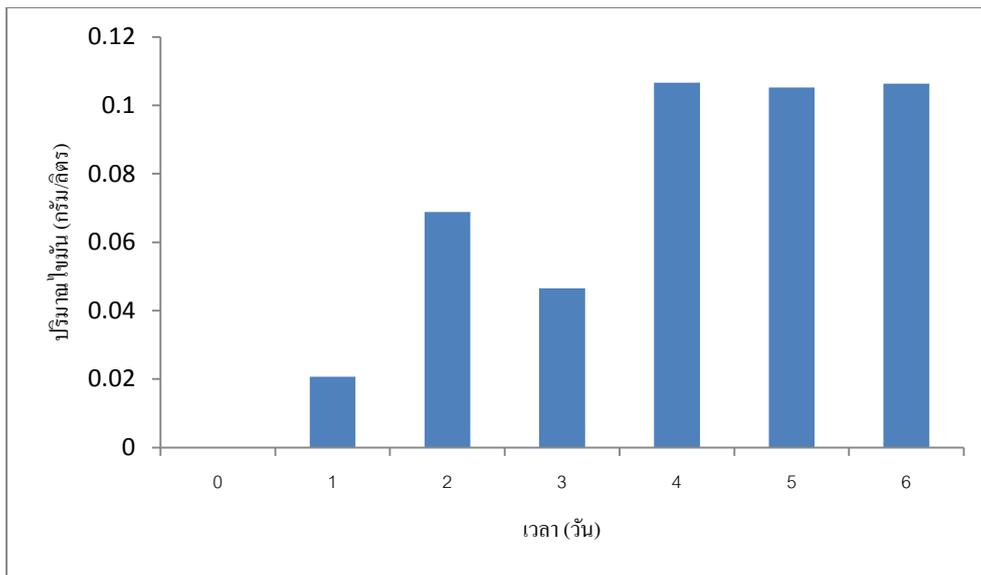
ภาพที่ 4.9 การเพาะเลี้ยงยีสต์ทนร้อน *Pichiasp.Scj 01* ในระดับถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสม โดยมีการเติมอากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที

### 4.4 ผลการทดสอบการผลิตไขมันของยีสต์ทนร้อน *Pichiasp.Scj01* ในกลีเซอรอลดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

หลังจากทราบสภาวะในการเจริญและการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์ *Pichiasp.Scj01* ในกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วจากนั้นจึงนำสภาวะดังกล่าวนี้มาเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมมหาวิทยาลัยขอนแก่นเมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลพบว่ามีกลีเซอรอลอยู่ 55.60% และนำมาทดสอบการผลิตไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium ที่เติมกลีเซอรอลดิบให้มีความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตรผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.10 และ 4.11



ภาพที่ 4.10 แสดงการเจริญในรูปปริมาณกลีเซอรอล(g/l) ปริมาณไขมัน โดยน้ำหนักแห้ง (%) ปริมาณเซลล์แห้ง (g/l) ปริมาณไขมัน (g/l) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ที่มีกลีเซอรอลดิบ 40 (g/l) ที่ 40 °C เป็นเวลา 6 วัน



ภาพที่ 4.11 แสดงปริมาณไขมันภายในเซลล์ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ *Pichiasp.Scj 01* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ที่มีกลีเซอรอลดิบ 40 (g/l)

จากภาพที่ 4.10 และ 4.11 เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichiasp.Scj 01* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบ 40 กรัม/ลิตร บ่มแบบเขย่าในตู้บ่มที่มีความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 6 วัน พบว่ายีสต์มีการเจริญเติบโตช้า และเริ่มคงที่ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากยีสต์สามารถใช้กลีเซอรอลดิบได้ในปริมาณเล็กน้อย จึงส่งผลให้ปริมาณไขมันที่ผลิตได้ต่ำมาก ปริมาณไขมันสูงสุดที่ผลิตได้คือ 0.106 กรัม/ลิตร หรือ 36.99 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตไขมันในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลาทั้งหมด 6 วัน พบว่าในอาหารที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 4 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาณไขมัน 1.35 กรัม/ลิตร หรือ 41.50 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการผลิตไขมันในกลีเซอรอลดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหลืออยู่ในวันสุดท้ายของกระบวนการหมักพบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลดิบคือ 1.27 และ 31.28 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในกลีเซอรอลดิบมีองค์ประกอบของธาตุต่างๆ หลายชนิด เช่น เมทานอล เกลือ น้ำ และสบู่ ซึ่งองค์ประกอบของธาตุเหล่านี้อาจมีผลกระทบต่อเจริญเติบโตและส่งผลให้การผลิตไขมันลดลง เนื่องมาจากตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เช่น เมทานอลหรือเอทานอลปะปนออกมาหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และผสมรวมอยู่ในกลีเซอรอล ดังนั้นเมื่อนำกลีเซอรอลมาใช้จึงส่งผลทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ (Marchand, 2012) และเมื่อทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Pichiasp.Scj01* ในอาหาร production medium ที่ลดความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบลงเหลือ 22.24 กรัม/ลิตร พบว่ายีสต์สามารถเจริญและผลิตไขมันเพิ่มสูงขึ้น ปริมาณไขมันที่ผลิตได้คือ 1.35 กรัม/ลิตร หรือ 39.93 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับผลได้จากการใช้สารตั้งต้น กลีเซอรอล

ริสุทธิ์ 40 กรัม/ลิตร กลีเซอรอลดิบ 40 กรัม/ลิตร และกลีเซอรอลดิบ 22.24 กรัม/ลิตร ผลได้คือ 0.03, 0.002 และ 0.069 กรัม/กรัมกลีเซอรอลจากการรายงานของ Liang et al. (2010) ได้ทดสอบการผลิตไขมันของเชื้อ *Cryptococcus curvatus* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch fermentation) ในอาหารที่เติมกลีเซอรอลดิบ เปรียบเทียบกับอาหารที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *Cryptococcus curvatus* สามารถเจริญ และผลิตไขมันได้ดีกว่าในอาหารเติมกลีเซอรอลดิบ เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเพิ่มขึ้นจาก 20 กรัม/ลิตร เป็น 40 กรัม/ลิตร พบว่าการเจริญของเชื้อ *Cryptococcus curvatus* ลดลงถึง 2.5 เท่า และไม่สามารถเจริญได้เมื่อ ความเข้มข้นเพิ่มสูงเป็น 60 กรัม/ลิตรเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานผลการวิจัยอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า เชื้อยีสต์ *Pichia sp. Scj01* มีศักยภาพเพียงพอในการผลิตไขมัน โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.7เปรียบเทียบการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ชนิดอื่นๆ ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

Strains	Biomass (g/l)	Lipid Content (%CDW)	Lipid Concentration (g/l)	Temp (°C)	Time (day)	Carbon Source (g/l)	Culture Type	References
<i>Pichiasp.Scj01</i>	4.76	63.52	2.99	40	4	PG (40)	Batch	this study
<i>Pichiasp.Scj01</i>	2.93	39.93	1.17	40	6	CG (22.24)	Batch	this study
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	118	25	29.5	28	2.1	PG (16)	Fed-batch	Meesters et al. (1996)
<i>Rhodotorulaglutinis</i> TISTR 5159	10.1	60.7	6.1	30	3	CG (95)	Fed-batch	Saenge et al. (2011)
<i>Yarrowialipolytica</i> ACA-DC 50109	7.0-7.9	6-14	3.8-25	28	6.1	CG (20.5-164)	Batch	Papanikolaou et al. (2008)
<i>Yarrowialipolytica</i> ACA-YC 5033	6.5	31	2	28	16.5	CG (6)	Batch	André et al. (2009)

PG: Pure glycerol (กลีเซอรอลบริสุทธิ์), CG: crude glycerol (กลีเซอรอลดิบ)

