

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
คำอุทิศ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 สถานที่ทำการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 กรดไขมัน	4
2.2 จุลินทรีย์สะสมไขมัน (Oleaginous microorganism)	10
2.3 ยีสต์และไขมันที่พบในยีสต์	11
2.4 กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันภายในเซลล์ยีสต์	15
2.5 กลไกการควบคุมการเมแทบอลิซึมของไขมันในยีสต์	19
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน	19
2.7 ไบโอดีเซล	22
2.8 กลีเซอรอล(Glycerol) วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	30
3.2 การเตรียมเชื้อและการเก็บรักษาเชื้อ	31
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี Colorimetric method	31
3.4 การวัดการเจริญโดยวิธี Cell dry weight	32
3.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล	32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า		
3.6	การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันที่ทนร้อน โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติ โดยการหาพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Design)	34
3.7	การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน <i>Pichia</i> sp. Scj 01 ในสภาวะที่เหมาะสมในระดับถังหมักชีวภาพขนาด 5 ลิตร	35
3.8	การสกัดและวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน	36
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1	การศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไขมัน	37
4.2	การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันที่ทนร้อน โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการออกแบบทางสถิติ (Statistical method)	38
4.3	การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>Pichia</i> sp. Scj 01 ในสภาวะที่เหมาะสมในระดับถังปฏิบัติการชีวภาพขนาด 5 ลิตร	49
4.4	ผลการทดสอบการผลิตไขมันของยีสต์ทนร้อน <i>Pichia</i> sp. Scj ในกลีเซอรอลดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	51
4.5	ผลการทดสอบชนิดของกรดไขมันของยีสต์ทนร้อน <i>Pichia</i> sp. Scj 01 ในกลีเซอรอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	55
บทที่ 5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	56
	เอกสารอ้างอิง	58
	ภาคผนวก	
	ภาคผนวก ก สูตรอาหาร	65
	ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน	66
	ประวัติผู้เขียน	68

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1	แสดงกรดไขมันสามัญ 8
ตารางที่ 2.2	กรดไขมันที่พบในยีสต์สะสมไขมันสูง 12
ตารางที่ 2.3	เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับไขมันจากพืชน้ำมัน 13
ตารางที่ 2.4	ไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> M-300-A ที่เจริญในกากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน 13
ตารางที่ 2.5	ไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Iz-1904 ที่เจริญในกากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน 14
ตารางที่ 2.6	แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 26
ตารางที่ 2.7	เปรียบเทียบการผลิตไขมันของยีสต์ <i>Rhodospiridiumtoruloides</i> กับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในอาหารที่เติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 28
ตารางที่ 3.1	แสดงปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน โดยวิธี Plackettburman 34
ตารางที่ 3.2	แสดงปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน โดยวิธี Central Composite Design (CCD) 35
ตารางที่ 4.1	แสดงระดับและปัจจัยที่ใช้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน <i>Pichiasp.Scj 01</i> โดยวิธี Plackettburman 39
ตารางที่ 4.2	การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยโปรแกรม Expert design โดยวิธี Plackettburman สำหรับคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน <i>Pichiasp.Scj 01</i> 40
ตารางที่ 4.3	ผลการวิเคราะห์ตัวแปรทางสถิติ (ANOVA) เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมัน <i>Pichiasp.Scj 01</i> โดยวิธี Plackettburman 41
ตารางที่ 4.4	แสดงระดับและปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Central Composite Design (CCD) ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไขมันของยีสต์ <i>Pichiasp.Scj 01</i> 43
ตารางที่ 4.5	การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วย Central Composite Design (CCD) ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ <i>Pichiasp.Scj 01</i> 44
ตารางที่ 4.6	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ANOVA) ของการออกแบบการทดลองด้วย Central Composite Design (CCD) ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ <i>Pichiasp.Scj 01</i> 45

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ชนิดอื่นๆ ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน	54
ตารางที่ 4.8 แสดงชนิดกรดไขมันที่ได้จากการผลิตของยีสต์ <i>Pichiasp.Scj01</i> โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น	55

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดไขมัน	4
ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างชนิดของกรดไขมันอิ่มตัว	6
ภาพที่ 2.3 ตัวอย่างชนิดของกรดไขมันไม่อิ่มตัว	6
ภาพที่ 2.4 ปฏิกริยาการแลกเปลี่ยนหมู่คาร์บอกซิลในกรดไขมัน	9
ภาพที่ 2.5 เซลล์ของยีสต์สะสมไขมัน <i>Cryptococcus curvatus</i> (ชื่อเดิม <i>Candida curvata</i>)	11
(a) ไขมัน 70% ของน้ำหนักเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	
(b) แสดงชั้นของหยดไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	
ภาพที่ 2.6 แสดงลักษณะเซลล์ยีสต์ <i>Pichiasp.Scj 01(a)</i> ลักษณะเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง	12
(b) ลักษณะเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว	
ภาพที่ 2.7 การนำเอา acetyl-CoA จากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาสซึม เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน	16
ภาพที่ 2.8 การสังเคราะห์กรดไขมันปาล์มิติกในไซโทพลาสซึม	17
ภาพที่ 2.9 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์	18
ภาพที่ 2.10 การผลิตไบโอดีเซลโดยผ่านปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน	22
ภาพที่ 2.11 ขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล	24
ภาพที่ 2.12 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	25
ภาพที่ 2.13 การสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์ไขมันสูงเมื่อมีกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น	27
ภาพที่ 3.1 ถังหมักชีวภาพ	35
ภาพที่ 4.1 แสดงการเจริญในรูปปริมาณกลีเซอรอล (g/l) ปริมาณไขมัน โดยน้ำหนักแห้ง (%) ปริมาณเซลล์แห้ง (g/l) ปริมาณไขมัน (g/l) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrogen-limiting medium ที่มีกลีเซอรอล 40 (g/l) ที่ 40 °C เป็นเวลา 10 วัน	37
ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณไขมันภายในเซลล์ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ <i>Pichiasp.Scj 01</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrogen-limiting medium ที่มีกลีเซอรอล 40 (g/l)	38
ภาพที่ 4.3 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย C ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์) กับ ปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) บนค่าที่เหมาะสมของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6 และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.4 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย D อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) กับ ปัจจัย B ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) บนค่าที่เหมาะสมของปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์และ ปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์	47
ภาพที่ 4.5 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย C ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์) กับ ปัจจัย B ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) บนค่าที่เหมาะสมของปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	47
ภาพที่ 4.6 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย D อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) กับปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) บนค่าที่เหมาะสมของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6 และปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์	48
ภาพที่ 4.7 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย D อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) กับปัจจัย C ปริมาณกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์) บนค่าที่เหมาะสมของเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6	48
ภาพที่ 4.8 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย B ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับปัจจัย A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) บนค่าที่เหมาะสมของปริมาณกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	49
ภาพที่ 4.9 การเพาะเลี้ยงยีสต์ทันทร้อน <i>Pichiasp.Scj 01</i> ในระดับถึงปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสม โดยมี การเติมอากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที่	51
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	52
ภาพที่ 4.11 แสดงปริมาณไขมันภายในเซลล์ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ <i>Pichiasp.Scj 01</i> เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ที่มีกลีเซอรอลดิบ 40 (g/l)	52