

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 จุลินทรีย์สะสมไขมัน (Oleaginous microorganisms)	4
2.2 ยีสต์และไขมันที่พบในยีสต์	5
2.3 กรดไขมัน (Fatty acid)	10
2.4 การผลิตไขมันในจุลินทรีย์สะสมไขมัน	13
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน	18
2.6 ไบโอดีเซล (Biodiesel)	25
2.7 มันเทศ (Sweet potato) วัตถุดิบทางเลือกที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน	26
2.8 กลูโคส (Glucose)	28
2.9 กลไกการย่อยแป้งเพื่อผลิตกลูโคส	29
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	34
3.2 การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน	35
3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ	36
3.4 การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ที่คัดแยกได้ด้วยวิธี Sudan Blank B	36
3.5 วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	36
3.6 การศึกษาการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ในระดับห้องปฏิบัติการ	38

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7 การศึกษาการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร	39
3.8 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งด้วยวิธีไอโอไดน์	40
3.9 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS	40
3.10 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค HPLC	40
3.11 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี Colorimetric method	41
3.12 วัดการเจริญด้วยวิธี Cell dry weight	41
3.13 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันที่ทนร้อน โดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการออกแบบการทดลอง ทางสถิติโดยการหาพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Design)	42
3.14 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันในสภาวะที่เหมาะสมใน ระดับถังหมักชีวภาพขนาด 2 และ 5 ลิตร	43
3.15 การสกัดและวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน	44
3.16 การจำแนกชนิดสายพันธุ์ของยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้	44
3.17 การทดสอบความสามารถการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้ชุดทดสอบ	45
3.18 การทดสอบการเจริญและการสะสมไขมันในอาหารสูตรต่างๆ	45
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สะสมไขมันจากแหล่งธรรมชาติ	46
4.2 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้	47
4.3 การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ โดยวิธี Sudan Black B และ โดยวิธี Colorimetric method	50
4.4 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	55
4.5 การศึกษาการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ในห้องปฏิบัติการ	56
4.6 ผลการศึกษาการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 50 ลิตร	63
4.7 การศึกษาปริมาณและชนิดน้ำตาลของน้ำเชื่อมมันเทศ	65
4.8 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันที่ทนร้อน โดย ใช้น้ำตาลจากการย่อยมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการออกแบบการทดลองทางสถิติ (Statistical method)	64
4.9 การศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท Scj 01 ในสภาวะที่เหมาะสมในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	77
4.10 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท Scj 01	82
4.11 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้	85

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.12 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	88
4.13 ผลการทดสอบการเจริญและการสะสมไขมันในอาหารสูตรต่างๆ ของซีสต์ไอโซเลท Scj 01	89
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	91
เอกสารอ้างอิง	93
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร	102
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน	103
ภาคผนวก ค การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์	106

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ <i>C.lipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i> และ <i>R. mucilaginosa</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน	7
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกรดไขมัน (% of total fatty acids) จาก <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> TJY15a	9
ตารางที่ 2.3 การผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันต่างชนิดกันในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน	19
ตารางที่ 2.4 ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของการเจริญและการสะสมไขมัน <i>Trichosporon fermentans</i>	23
ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ <i>Hansenula polymorpha</i> ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน	24
ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบของกรดไขมันยีสต์ <i>Candida curvata</i> ที่เจริญในแหล่งคาร์บอนต่างกันในสภาวะจำกัดแหล่งไนโตรเจน	25
ตารางที่ 2.7 ปริมาณค่าองค์ประกอบของสารอาหารในมันเทศ	27
ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบของน้ำตาลในมันเทศ 7 สายพันธุ์	28
ตารางที่ 2.9 แสดงการเปรียบเทียบความหวานของน้ำตาลชนิดต่างๆ	29
ตารางที่ 3.1 ชุดการทดลองที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาปริมาณแป้งมันเทศที่เหมาะสมในการย่อยมันเทศด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการย่อยแบบกึ่งกะ (Fed - batch)	38
ตารางที่ 3.2 แสดงระดับและปัจจัยที่ใช้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันโดยวิธี Plackett burman	43
ตารางที่ 3.3 ปัจจัยและระดับปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์	44
ตารางที่ 4.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ	46
ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จาก จากฟางข้าว(Rc), กากถั่วเหลือง(Sbc), ก้อนแป้งสาโท(Yc, Satho) ที่อุณหภูมิต่างๆ	47
ตารางที่ 4.3 ผลทดสอบการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำอ้อยเน่าเสีย (Scj) ที่อุณหภูมิสูงต่างๆ	48
ตารางที่ 4.4 ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร) ของยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงทั้ง 7 ไอโซเลทที่เจริญในอุณหภูมิต่างๆ	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.5 การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ โดยวิธี Sudan Black ของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกรายจากฟางข้าวแห้ง (Rc), กากถั่วเหลือง (Scb), ก้อนแป้งสาโท (Yc, Satho)	51
ตารางที่ 4.6 การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ โดยวิธี Sudan Black ของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกรายจากน้ำอ้อยเน่าเสีย (Scj)	52
ตารางที่ 4.7 ชุดการทดลองเพื่อศึกษาการหาความเข้มข้นของมันเทศในการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส	58
ตารางที่ 4.8 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลจากน้ำหมักมันเทศ	65
ตารางที่ 4.9 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลจากที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส	66
ตารางที่ 4.10 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลจากที่ย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส	66
ตารางที่ 4.11 แสดงระดับและปัจจัยที่ใช้คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Sj 01 โดยวิธี Plackett burman	65
ตารางที่ 4.12 การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วย Expert design โดยวิธี Plackett burman สำหรับการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01	69
ตารางที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์ตัวแปรทางสถิติ (ANOVA) เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01 โดยวิธี Plackett burman	70
ตารางที่ 4.14 ปัจจัยและระดับปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วย Box Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ไอโซเลท Scj 01	72
ตารางที่ 4.15 การออกแบบการทดลองทางสถิติด้วย Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ไอโซเลท Scj 01	7
ตารางที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ANOVA) ของการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์ไอโซเลท Scj 01	74
ตารางที่ 4.17 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่ได้จากการสกัดไขมันจากยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Scj 01	82
ตารางที่ 4.18 เปรียบเทียบชนิดของกรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์ต่างๆ	84
ตารางที่ 4.19 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่หมักทั้ง 7 สายพันธุ์	85
ตารางที่ 4.20 ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ Scj 01	88

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	โครงสร้างของกรดไขมัน
ภาพที่ 2.2	ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูง OYS3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 90 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน
ภาพที่ 2.3	โครงสร้างของกรดไขมัน
ภาพที่ 2.4	ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว
ภาพที่ 2.5	ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน
ภาพที่ 2.6	โครงสร้างของกรดไขมัน
ภาพที่ 2.7	การนำเอา acetyl-CoA จากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทพลาสซึม เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน
ภาพที่ 2.8	การสังเคราะห์กรดไขมันปาล์มลิกในไซโทพลาสซึม
ภาพที่ 2.9	การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์
ภาพที่ 2.10	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและสะสมไขมันของ <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> TJY15a
ภาพที่ 2.11	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและสะสมไขมันของ <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> TJY15a
ภาพที่ 2.12	กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ภาพที่ 2.13	มันเทศ (Sweet potato)
ภาพที่ 2.14	โครงสร้างของกลูโคส
ภาพที่ 2.15	โครงสร้างอะไมเลส
ภาพที่ 2.16	โครงสร้างอะไมโลเพคติน
ภาพที่ 3.1	การเตรียมวัตถุดิบมันเทศ
ภาพที่ 3.2	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 50 ลิตร
ภาพที่ 3.3	ถังหมักชีวภาพ

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 4.1	ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่คัดแยกได้ในการทดสอบการเจริญที่มี การแปรผันอุณหภูมิ (A) ไอโซเลท Yc 02, (B) ไอโซเลท Rc03, (C) ไอโซเลท Sbc06	50
ภาพที่ 4.2	ลักษณะเซลล์ยีสต์ที่ย้อมสี โดยวิธี Sudan Blank	51
ภาพที่ 4.3	กราฟแสดงปริมาณไขมันที่สกัดได้จากยีสต์สะสมไขมันด้วยวิธี Colorimetric method โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Production medium อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพาะที่ความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8 วัน	53
ภาพที่ 4.4	ลักษณะเซลล์ยีสต์ไอโซเลท Scj01 ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์	54
ภาพที่ 4.5	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับ ห้องปฏิบัติการที่การแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 6% (60 กรัม/ลิตร) ย่อยในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที	57
ภาพที่ 4.6	แสดงปริมาณแป้งที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับห้องปฏิบัติ การที่การแปรผันการแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 6 % (60 กรัม/ลิตร) ย่อยในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที	58
ภาพที่ 4.7	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับห้องปฏิบัติการ ที่แปรผันความเข้มข้นมันเทศ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ย่อยในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็น กรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที	60
ภาพที่ 4.8	แสดงปริมาณแป้งที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับห้องปฏิบัติการ ที่แปรผันปริมาณความเข้มข้นมันเทศ ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ย่อยในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที	60
ภาพที่ 4.9	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับห้อง ปฏิบัติการที่การแปรผันความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่ ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 12 % (120 กรัม/ลิตร) ย่อยในสภาวะที่มี อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.10 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแป้งที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 12 % (120 กรัม/ลิตร) ที่ความเข้มข้นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100,000 หน่วย/มิลลิลิตร ย่อยในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-7.0 เป็นเวลา 120 นาที รอบการกวน 160 รอบ/นาที	64
ภาพที่ 4.11 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยมันเทศในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 10,000 หน่วย/มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นมันเทศเริ่มต้น 12 % (120 กรัม/ลิตร) ย่อยในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รอบการกวน 160 รอบ/นาที	65
ภาพที่ 4.12 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ (ก) และ กราฟคอนทัวร์ (ข) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย A ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับ ปัจจัย B ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm) บนค่าที่เหมาะสมของปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 3 %	75
ภาพที่ 4.13 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ (ก) และ กราฟคอนทัวร์แสดง (ข) อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย A ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับ ปัจจัย C ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (%) บนค่าที่เหมาะสมของความเร็วรอบในการเขย่าที่ 200 rpm	75
ภาพที่ 4.14 กราฟพื้นที่ผิวการตอบสนอง 3 มิติ (ก) และกราฟคอนทัวร์ (ข) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่าง ปัจจัย B ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm) กับปัจจัย C ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (%) บนค่าที่เหมาะสมของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 4	76
ภาพที่ 4.15 ผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ทนร้อนไอโซเลท Scj 01 ในระดับถึงปฏิกรณ์ 5 ลิตร ในสภาวะที่เหมาะสมโดยมีการเติมอากาศที่ 1 vvm	79
ภาพที่ 4.16 ผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท Scj 01 แบบกะ (Batch) ในระดับถึงปฏิกรณ์ 2 ลิตร	80
ภาพที่ 4.17 ผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท Scj 01 แบบกึ่งกะ (Fed- Batch) ในระดับถึงปฏิกรณ์ชีว 2 ลิตร	81
ภาพที่ 4.18 ผลการทดสอบการเจริญและการสะสมไขมันของยีสต์ Scj 01 ในอาหาร 5 สูตร	89