

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดนี้เมื่อเตรียมตามสูตรอาหารเรียบร้อยแล้วจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.สูตรอาหาร YPG agar

glucose	20	กรัม/ลิตร
yeast extract	10	กรัม/ลิตร
peptone	10	กรัม/ลิตร
วุ้น	15	กรัม/ลิตร
pH	6	

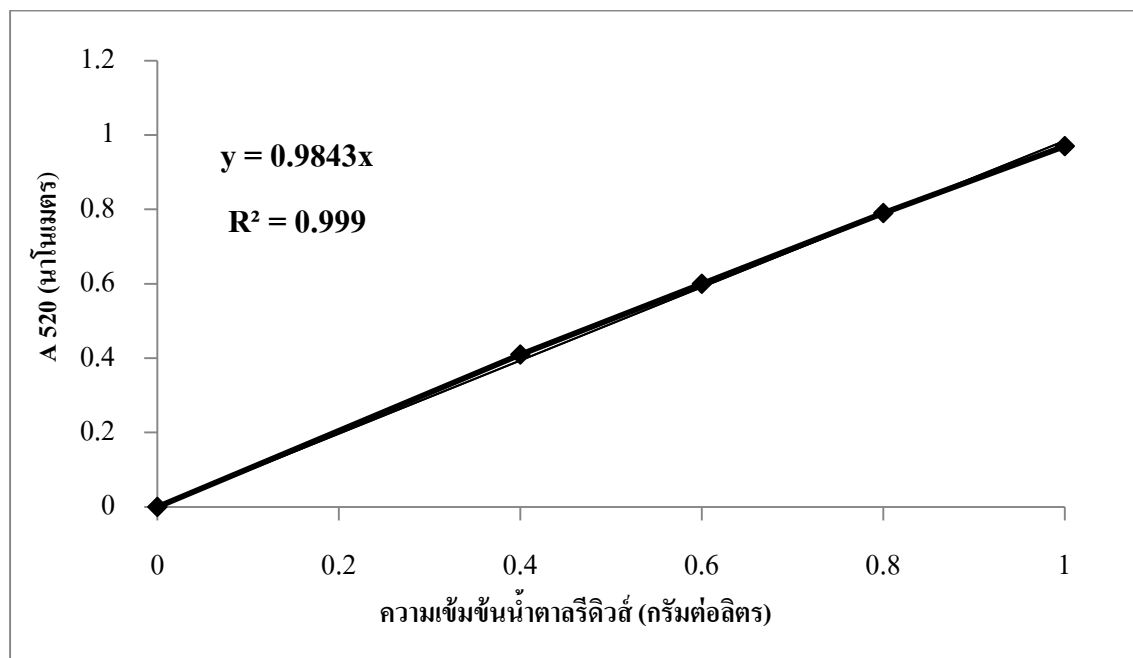
2. สูตรอาหาร Production medium

yeast extract	0.5	กรัม/ลิตร
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5	กรัม/ลิตร
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	กรัม/ลิตร
KH ₂ PO ₄	1.0	กรัม/ลิตร
pH	6	

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ข-1 แสดงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (1 กรัม/ลิตร) แล้วแปรผันความเข้มข้นในการทำกราฟ
มาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

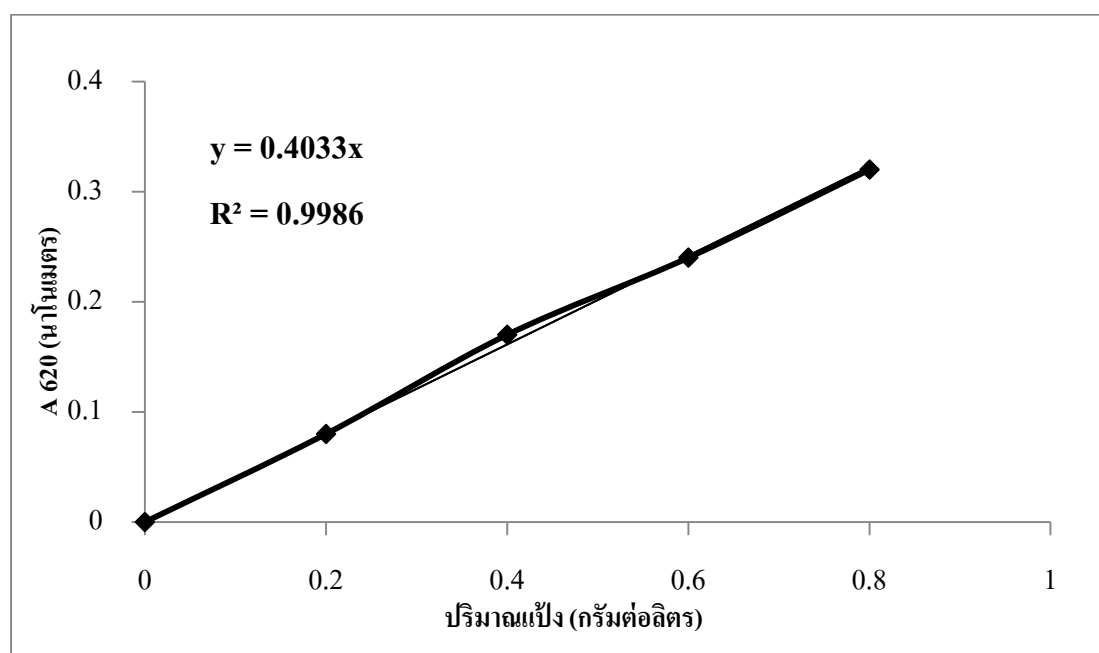
ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณสารละลายมาตรฐานกลูโคส จาก 1 กรัม/ลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	10
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	0



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

ตารางที่ ข-2 แสดงความเข้มข้นของแป้ง (1 กรัม/ลิตร) แล้วแปรผันความเข้มข้นในการทำกราฟมาตรฐาน
ปริมาณแป้ง

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณสารละลายมาตรฐานกลูโคส จาก 1 กรัม/ลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	10
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	0



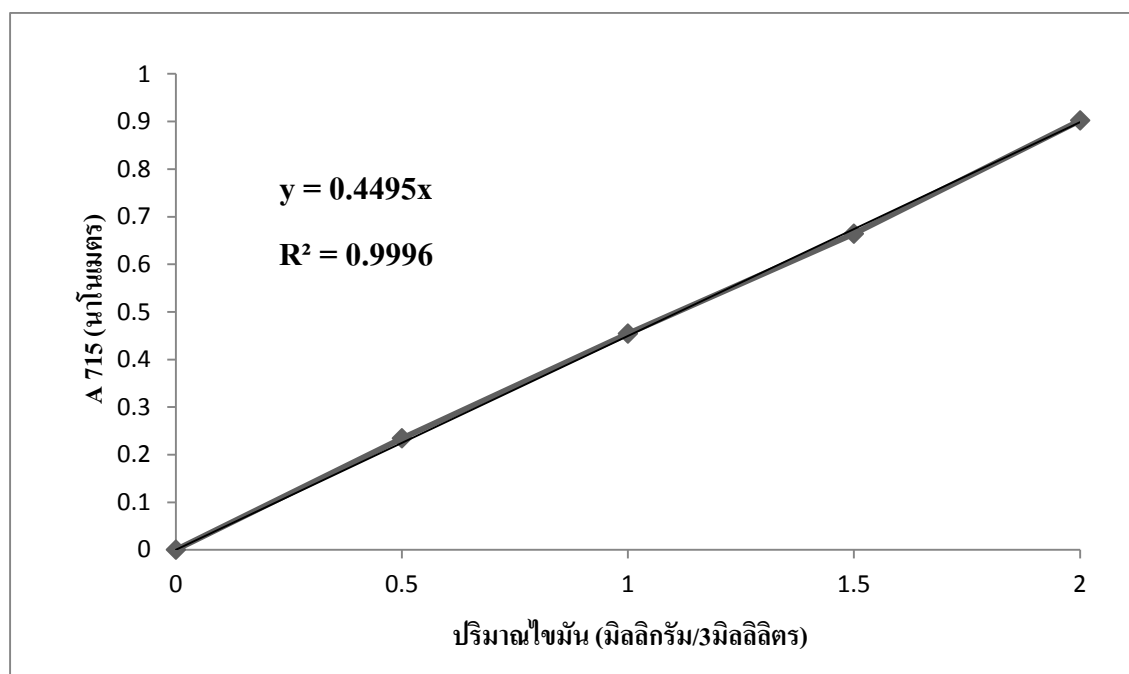
รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานของปริมาณแป้งสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแป้งด้วยวิธีไอโอดีน

ตารางที่ ข-3 สารละลายกรดไขมันมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ จากสารละลายกรดปาล์มิติก 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธี colorimetric method สารละลายมาตรฐาน (stock solution): 10mg/ml โดยซึ่งกรดไขมันปาล์มิติก 1 กรัม ละลายใน isooctane ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ จากสารละลายกรดปาล์มิติก 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย isooctane ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง

ความเข้มข้นของสารละลายกรด ปาล์มิติก (mg/3ml solution)	ปริมาณ stock standard (มิลลิลิตร)	ปริมาณของ isooctane (มิลลิลิตร)
0.5	0.15	2.85
1.0	0.30	2.70
1.5	0.45	2.55
2.0	0.60	2.40

ปิเปตแต่ละความเข้มข้นมา 3 มิลลิลิตร เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าแรงๆ 1-2 นาทีทิ้งไว้สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร แล้วทำกราฟมาตรฐาน



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธี colorimetric method

ภาคผนวก ค
การเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์

ภาคผนวก ค-1

The 4th International Conference on
“Fermentation Technology for value Added Agricultural Product”
August 29th – 31th, 2011 at Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand

Screening of thermotolerant oleaginous yeasts from spoiled sugar cane juice, rice stalk and soybean cake for
microbial oil production

The 4th International Conference **FerVMAP** 2011

on
Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products

with
Joint Sessions from Asian Core Program
on "Capacity Building and Development of Microbial Potential
and Fermentation Technology
Towards New Era"

August 29th-31st, 2011
Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand



BOOK OF ABSTRACTS

13	Aspect of physical parameters for xylanases production by <i>Bacillus subtilis</i> GN156	112
	<i>Tontana Kuantha and Jirawan Aphirakakorn</i>	
Area 2: Core Program Poster Presentations		
14	Solid-state cultivation of <i>Monascus purpureus</i> NK1 for the pigment production using crispy rice residue as a substrate	113
	<i>Chattana Khongratnapakultra, Nopkorn Chaulet, Sirakol Saipa, Wana Pathom-Aree, Shigekazu Yano, Toshiaki Matsunaga, Manoru Malayawan, Motoji Kato, Takashi Tachiki and Akitsugu Pitkanol</i>	
15	Effects of <i>Bacillus</i> sp. UBRU4 cell concentration when using with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> as probiotic on growth and immune response of Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	114
	<i>Chaler Bratanan, Kestree Chantarasophon and Vichai Leetanacharawan</i>	
16	Screening of thermotolerant oleaginous yeasts from spoiled sugar cane juice, rice stalk and soybean cake for microbial oil production	115
	<i>Piyawat Buayai, Manoo Kikhida and Vichai Leetanacharawan</i>	
17	Optimum conditions for bacteriocin production by lactic acid bacteria using cheap medium of tofu sour liquid and brewer's grains	116
	<i>Hayah Xuan Phung and Ngo Thi Phuong Dung</i>	
18	Inhibition of <i>Edwardsiella ictaluri</i> (causative of enteric septicemia of catfish) by lactic acid bacteria isolated from fermented fish products	117
	<i>Nguyen Thanh Tam, Le Van Tuan, Dang Thi Thu Thao and Nguyen Van Ba</i>	
19	Geographical distribution of thermotolerant ethanol fermenting yeasts and their characterization	118
	<i>Chanon Keo-Adkue, Phrasenath Saitthan, Noppon Lertvattanasakul, Napatchanon Thangmuang, Saritree Linnong and Manoru Yamada</i>	

Screening of thermotolerant oleaginous yeasts from spoiled sugar cane juice, rice, stalk and soybean cake for microbial oil production

Piyawan Buayai^{1*}, Masao Kishida² and Vichai Leelavatcharamas^{1,3}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, 40002, Thailand

²Division of Applied Life Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Nakai-ku, Sakai, Osaka, 599-8531

³Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products (FerVAAP), Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

*Corresponding author: buayai.pw@gmail.com

Screening of thermotolerant yeast strains for single cell oil production from spoiled sugar cane juice, yeast cake (for Thai rice wine production), dried rice stalk and soybean cake (waste from soya milk producing process) was conducted. Twenty two, 3, 5 and 7 isolates of yeast were obtained from spoiled sugar cane juice, yeast cake, dried rice stalk and soybean cake, respectively. All isolates were further screened for thermotolerant yeast by agar drop plate test at 30, 35, 40 and 45 °C. All of the isolated yeast strains could be able to grow at 40 °C and there was only 1 isolate, which was Sej 0E, could grow at 45 °C. Seven isolates of the thermotolerant yeasts, which were Sej 01, Sej 11, Sej 0A, Sej 0E, Ye 02, Ra 03, and Sbc 06, were selected for further oil accumulation study. The results of oil content determination by Colorimetric method of the selected 7 thermotolerant yeast strains showed that the yeast strain Sbc 06 contained the highest oil content (0.592 mg/ 3 ml). This strain was further identified by molecular biological technique and found that it similar to *Candida tropicalis* (98% identity).

Keywords: Thermotolerant, Oleaginous yeasts, Single cell oil production

ภาคผนวก ค-2

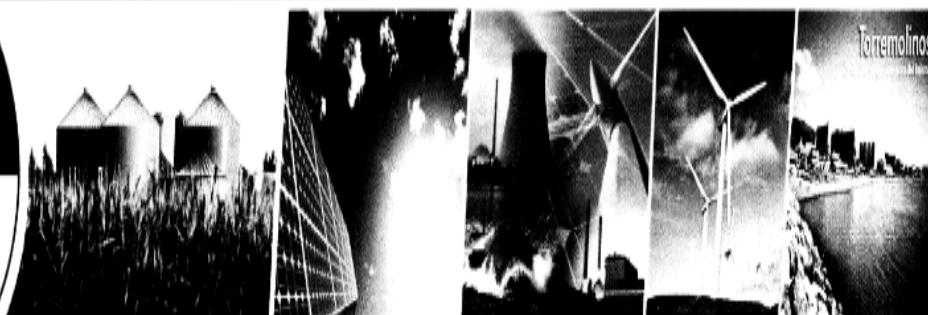
The Energy and Materials Research Conference (EMR 2012)

Torremolinos, Spain, 20-22 June 2012

Economical sweet potato enzymatic hydrolysis for using as carbon source for single cell oil
production by thermotolerant oleaginous yeast

The Energy & Materials Research Conference

**EMR
2012**



Book of Abstracts

Torremolinos, Spain, 20-22 June 2012

<http://www.formatex.org/emr2012>

CONTENTS

Introduction	1
Energy production from Biomass - Biofuels	
A comparison of the use of dilute aqueous <i>p</i> -toluenesulfonic acid and sulfuric acid in single step pretreatment - saccharification of biomass	2
Advanced biofuels - bioethanol and biodiesel from lignocellulosic substrates	3
An experimental investigation of the biodiesel stability by means of oxidation and property determination	4
Application of Anaerobic Co-digestion for Utilization of Seaweed, Pectin and Carrageenan Waste	5
Artificial neural networks approach for the prediction of thermal balance of SI engine using bioethanol- gasoline blends	6
Atmospheric CO ₂ sequestration through mineral carbonation of industrial solid wastes and their utilization in plant growth	7
Bioalcohols from biowastes: an assessment of current technologies	8
Bioenergy in Sweden	9
Biogas production from co-digestion by-products from biodiesel industry	10
Biomass energy from indigenous oil yielding plants in Pakistan	11
Build-up granulation of lignin sludge's as innovative process improving its energy	12
Catalytic microwave-assisted pyrolysis of biomass for biofuels and chemicals production	13
Characterisation of corn starch content for bio-ethanol production purpose	14
Characteristics of Biodiesel Fuels Applied to Diesel Engine	15
Chemical interesterification of rapeseed oil with ethyl acetate using methanolic sodium methoxide and <i>t</i> -butanolic potassium butoxide solutions as catalysts	16
Chemiometric study of biodiesel production from soybean oil	17
Co-product recovery from biomass during ethanol production	18
CO ₂ Capture by a Synthetic, CaO-containing Sorbent in a Fixed-bed Reactor	19
Cold flow properties investigation of some blended biodiesels from safflower and soybean	20
Comparative performance analysis of a compression ignition engine fuelled with biodiesel blends	21
Cultivation of microalgae with diluted primary olive mill wastewater for bio-fuel production	22
Deconstructing sugarcane cell wall for the production of second generation ethanol	23
Detection of greenhouse gas precursors from the biofuel combustion and binary mixtures of diesel measured by analytical techniques	24
Dual-frequency ultrasound-assisted reactor for transesterification of vegetable oils aiming at biodiesel production	25
Economical bioethanol fermentation of different kind of corn hybrids	26
Economical sweet potato enzymatic hydrolysis for using as carbon source for single celloil production by thermotolerant oleaginous yeast	27
Effect of the biodiesel from waste oil in the metals composition in lubricative oil	28
Effect of the temperature in ethanol and xylitol production by <i>Hansenula polymorpha</i> using hydrolysates of sunflower stalks	29

Economical sweet potato enzymatic hydrolysis for using as carbon source for single celloil production by thermotolerant oleaginous yeast

Piyawan Buayai¹, Vichai Leelavatcharamas^{2,3,*}, Masao Kishida⁴

¹ Graduate School, KhonKaen University, KhonKaen, 40002, Thailand ² Department of Biotechnology, Faculty of Technology, KhonKaen University, KhonKaen, 40002, Thailand

³ Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products (FerVAAP), KhonKaen University, KhonKaen, 40002, Thailand

⁴ Division of Applied Life Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka, 599-8531, Japan

*Corresponding author: vichai@hotmail.com

In this work, the economical glucose syrup production from sweet potato hydrolysis and utilization of the obtained hydrolysate for single oil production by thermotolerant oleaginous yeast were studied. The Novozyme α -amylase and β -glucosidase were used for the liquefaction and saccharification steps of sweet potato hydrolysis, respectively. It was found that the highest sweet potato concentration which still could be able to stir after boiling was 60 g/l. This concentration was, thus, used for original substrate concentration for further studies. The optimum concentrations of α -amylase for hydrolysis of 60 g/l of sweet potato at 90 °C and pH 6.5-7.0 for 120 min were 100,000 Unit/ml. The obtained reducing sugar content after the hydrolysis was 26.4 g/l. In order to save the enzyme cost, 30 g/l of substrates were further added directly twice after the liquefaction step of α -amylase (total substrate was 120 g/l). The final obtained reducing sugar concentration was 50.8 g/l. The optimum β -glucosidase concentration in the further saccharification step for 48 hour at 60 °C and pH 4.3 - 4.5 was 10,000 Unit/ml. The final reducing sugar concentration of 99.1 g/l was obtained. The obtained glucose syrup from sweet potato hydrolysis was further used for single cell oil production by thermotolerant oleaginous yeast Scj01 strain at 40 °C. The result showed that the obtained lipid content was 2.24 g/l or 42.5% (w/w) on the cell dry weight basis, which was higher than some reported strains. The optimum conditions for the thermotolerant yeast Scj01 growth and oil accumulation by using the sweet potato hydrolysate could possibly improve the oil content accumulation and need further studies.

Keywords: single cell oil, sweet potato, Biodiesel, thermotolerant oleaginous yeast, glucose syrup

ภาคผนวก ค-3

การประชุมผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 25
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร วันที่ 4-6 ตุลาคม 2555

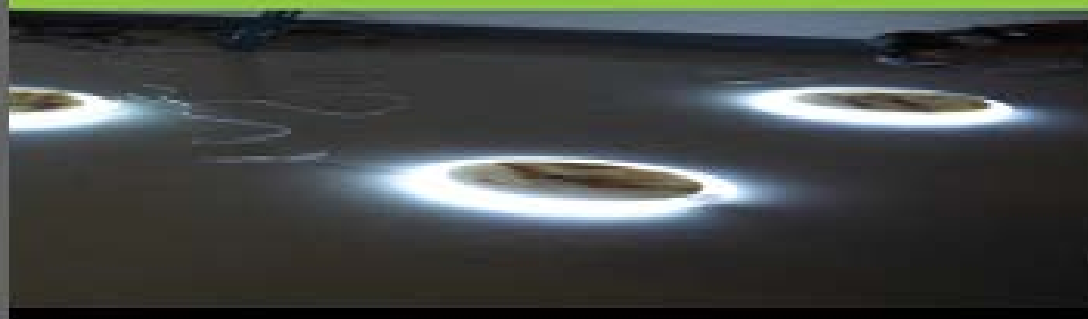
การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันที่ทนอุณหภูมิสูงจากของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อผลิตน้ำมันเซลล์เดียว
Isolation of thermotolerant oleaginous yeasts from agro-industrial wastes for single cell oil production



การประชุมเสนอผลงานวิจัย
ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ ๒๕
The 25th
National Graduate Research Conference

สนับสนุนโดย: มหาวิทยาลัยสุโขทัย

๔ - ๕ ตุลาคม ๒๕๕๕ ณ ศูนย์ประชุมอิมพีเรียลฮิลล์ (อิมพีเรียลคอนเวนชัน)





การประชุมเสนอผลงานวิจัย
ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 25

จัดโดย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การประดิษฐ์วิธีปลูกไม้โตเร็วในดินทรายและดินเค็มจากป่าชายหาด บุญรอด วัฒพันธ์, รศ.ดร. วิมลทิพย์ วรรณพงษ์วิบูลย์ การศึกษาคุณสมบัติของไม้โตเร็วในดินทรายและดินเค็มเป็นแนวทางหนึ่งของการแก้ปัญหาในสวนหาดต่างๆ และประติมากรรมศิลปะในการออกแบบสวนเขื่อน <i>Santhakachit</i> ๒๐/๖/๒๕๕๕ <i>Shanthakachit Typhimarium</i> วิมลทิพย์ วรรณพงษ์, วิมลทิพย์ วรรณพงษ์วิบูลย์	2701
การพัฒนาระบบนิเวศสวนป่าสงวนแห่งชาติเขื่อนศรีนครินทร์ เพื่อพัฒนาป่าอนุรักษ์ไว้ใช้ประโยชน์ ณัฐพร พิพิษฐ์, รศ. ดร. วิมล อนุศิริบุญ, ดร. วิมลมา ภาสกร การพัฒนาระบบนิเวศสวนป่าสงวนแห่งชาติเขื่อนศรีนครินทร์เพื่อพัฒนาป่าอนุรักษ์ไว้ใช้ประโยชน์ วิมลมา ภาสกร, ณัฐพร พิพิษฐ์, วิมล อนุศิริบุญ	2716
การศึกษากาชาดของทางใบในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ของพืชในสวนป่าเขื่อนศรีนครินทร์ บุญรอด วัฒพันธ์, วิมลทิพย์ วรรณพงษ์วิบูลย์	2727
การศึกษากาชาดของทางใบในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ของพืชในสวนป่าเขื่อนศรีนครินทร์ บุญรอด วัฒพันธ์, วิมลทิพย์ วรรณพงษ์วิบูลย์	2740
การศึกษากาชาดของทางใบในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ของพืชในสวนป่าเขื่อนศรีนครินทร์ บุญรอด วัฒพันธ์, วิมลทิพย์ วรรณพงษ์วิบูลย์	2749
การพัฒนาระบบนิเวศสวนป่าสงวนแห่งชาติเขื่อนศรีนครินทร์ เพื่อพัฒนาป่าอนุรักษ์ไว้ใช้ประโยชน์ บุญรอด วัฒพันธ์, วิมลทิพย์ วรรณพงษ์วิบูลย์	2753
การพัฒนาระบบนิเวศสวนป่าสงวนแห่งชาติเขื่อนศรีนครินทร์ เพื่อพัฒนาป่าอนุรักษ์ไว้ใช้ประโยชน์ บุญรอด วัฒพันธ์, วิมลทิพย์ วรรณพงษ์วิบูลย์	2766
การพัฒนาระบบนิเวศสวนป่าสงวนแห่งชาติเขื่อนศรีนครินทร์ เพื่อพัฒนาป่าอนุรักษ์ไว้ใช้ประโยชน์ บุญรอด วัฒพันธ์, วิมลทิพย์ วรรณพงษ์วิบูลย์	2781
การพัฒนาระบบนิเวศสวนป่าสงวนแห่งชาติเขื่อนศรีนครินทร์ เพื่อพัฒนาป่าอนุรักษ์ไว้ใช้ประโยชน์ บุญรอด วัฒพันธ์, วิมลทิพย์ วรรณพงษ์วิบูลย์	2792

การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันที่ทนอุณหภูมิสูงจากของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร เพื่อผลิตน้ำมันเซลล์เดียว

Isolation of thermotolerant oleaginous yeasts from agro-industrial wastes for single cell oil production

ปิยวรรณ บัวใหญ่ (Piyawan Buayai)^{1,*}, วิชัย ลีลาวัชรมาส (Vichai Leelavatcharamas)^{2,3}

¹นักศึกษาลัทธิศาสตร์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี รัศมีบัณฑิต
วิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*E-mail: keemaing_took1@windowslive.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกยีสต์ที่สามารถสะสมไขมันสูงที่ทนอุณหภูมิสูงเพื่อใช้เป็นน้ำมัน เซลล์เดียว (Single cell oil) สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล จากการศึกษาสามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อน สำหรับการผลิตน้ำมันเซลล์เดียวได้ 22, 3, 5 และ 7 ไอโซเลท จากน้ำอ้อยคั้นเน่าเสีย, ลูกแป้งสาโท, ฟาง ข้าวแห้ง และกากถั่วเหลืองที่เป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการทำน้ำเต้าหู้ ตามลำดับ โดยยีสต์ที่คัดแยกได้ ทั้งหมดนี้ จะนำไปทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45 °C โดยการหยดตัวอย่างเชื้อลงบน อาหารแข็ง (drop plate) โดยยีสต์ทั้งหมดสามารถเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 40 °C และมี 1 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 °C คือ Scj 0E และมี 7 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 °C คือ Scj 01, Scj 11, Scj 0A, Scj 0E, Yc 02, Rs 03, และ Sbc 06 เมื่อนำยีสต์ทั้ง 7 ไอโซเลทไปเพาะเลี้ยงเพื่อ ศึกษาการสะสมไขมันที่มีน้ำเชื่อมมันเทศที่ย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยวิเคราะห์ปริมาณ ไขมันด้วยวิธี Colorimetric method พบว่าสายพันธุ์ Scj 01 สามารถสะสมไขมันได้สูงสุดที่ 0.410 mg/3ml นอกจากนี้ยีสต์ Scj 01 ยังสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถสะสม ไขมันได้ถึง 0.452 mg/3ml

คำสำคัญ : ยีสต์สะสมไขมันสูง, ทนร้อน, น้ำมันเซลล์เดียว, ไบโอดีเซล

Abstract

The purpose of this study was isolation of thermotolerant oleaginous yeast for producing single cell oils for using as the potential feedstock for biodiesel production. Isolation of thermotolerant yeast strains for single cell oil production from spoiled sugar cane juice, yeast cake (starter for Thai rice wine production), dried rice stalk and soybean paste (waste from soya milk producing process) was conducted. Twenty two, 3, 5 and 7 isolates of yeast were obtained from spoiled sugar cane juice, yeast cake, dried rice stalk and soybean paste, respectively. All isolates were further screened for thermotolerant yeast by agar drop plate test at 30, 35, 40 and 45 °C. All of the isolated yeast strains could be able to grow at 40 °C and there was only 1 isolate, which was Scj 0E, could grow up to 45 °C. Seven isolates of the thermotolerant yeasts, which were Scj 01, Scj 11, Scj 0A, Scj 0E, Yc 02, Rs 03, and Sbc 06, were selected for further oil accumulation study. The results of oil content determined by Colorimetric method of the selected 7 thermotolerant yeast strains, using sweet potato hydrolysate as the carbon source, showed that the yeast strain Scj 01 contained the highest oil content of 0.410 mg/3ml. This yeast isolate could also utilize glycerol. The obtained oil content when using glycerol as the carbon source was 0.452 mg/ 3 ml.

Keyword: Oleaginous yeast, Thermotolerant, Single cell oil, Biodiesel

บทนำ

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมไขมันได้สูงกว่า 20% โดยน้ำหนักแห้ง เรียกว่า จุลินทรีย์ไขมันสูง หรือจุลินทรีย์สะสมไขมัน (oleaginous microorganism) ซึ่งการสะสมไขมันของจุลินทรีย์พบได้ทั้งในยีสต์ รา และแบคทีเรีย โดยจุลินทรีย์จะมีการผลิตไขมันและสะสมไขมันในรูปหยดน้ำมันเล็กๆ (microdroplet oils) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักพบการสะสมไขมันของจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเกินพอ และจำกัดปริมาณสารอาหารอื่นๆ ที่มีผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์จุลินทรีย์ (รัตนภรณ์, 2551) และยีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *Cryptococcus* sp., *Rhodospiridium* sp., *Lipomyces* sp. และ *Rhodotorula* sp. จะมีการสะสมไขมันได้สูงกว่าถึง 70% โดยน้ำหนักแห้งซึ่งถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีการผลิตไขมัน และการสะสมไขมันมากที่สุดในขณะนี้ (Cuimin et al, 2009) โดยองค์ประกอบของไขมันประมาณ 95% เป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ที่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดปาลมิติก (palmitic acid; C16:0) กรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) และกรดสเตียริก (stearic acid; C18:0) ซึ่งมีความคล้ายกับน้ำมันจากพืช โดยองค์ประกอบและปริมาณที่พบที่คล้ายกับไขมันพืชนั้น ทำให้ไขมันจากจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซลได้เช่นเดียวกับน้ำมันพืชโดยผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน (tran-esterification) และเนื่องจากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบกว่าการปลูกพืชน้ำมัน คือ ยีสต์สะสมไขมันสามารถเจริญเติบโตได้ดีและเร็ว มีช่วงการเจริญเติบโตสั้นทั้งยังเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย ซึ่งมีความเหมาะสมกับการนำมาเป็นทางเลือกในการผลิตไขมันเพื่อใช้ผลิตไบโอดีเซล (รัตนภรณ์, 2551)

ในปัจจุบันมนุษย์มีความต้องการใช้พลังงานจากน้ำมันอย่างมากทั้งในด้านคมนาคม อุตสาหกรรมการผลิต ทำให้ปริมาณน้ำมันไม่เพียงพอตามไปด้วย และจากวิกฤตการณ์น้ำมันปิโตรเลียมและภาวะโลกร้อน ซึ่งโดยธรรมชาติแล้วมีน้ำมันปิโตรเลียมอย่างจำกัด และเป็นพลังงานฟอสซิลที่ใช้แล้วหมดไป แต่พลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพเป็นพลังงานที่ใช้แล้วไม่มีวันหมด (Pan et al, 2008) จึงทำให้มีการส่งเสริมการปลูกพืชน้ำมันเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพมากขึ้น โดยเฉพาะไบโอดีเซล ซึ่งอาจส่งผลให้พืชอาหารมีราคาสูงขึ้นและขาดแคลนได้ ดังนั้นจึงต้องมีการจัดหาแหล่งพลังงานทดแทนอื่นแทนพืชน้ำมัน โดยงานวิจัยนี้ได้เห็นความสำคัญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตไขมันได้สูงและสามารถเจริญในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงได้ เนื่องด้วยปัจจุบันโลกเรากำลังเผชิญกับปัญหาภาวะโลกร้อนทำให้อุณหภูมิของโลกสูงกว่าในอดีต จึงมีความต้องการที่จะหาพืชที่สามารถทนอุณหภูมิที่สูง เพื่อเป็นการลดพลังงานในการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วย ซึ่งน้ำมันจากยีสต์เป็นวัตถุดิบทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการใช้ทดแทนหรือใช้ร่วมกับน้ำมันพืชในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งน้ำมันหรือไขมันที่ได้จากยีสต์มีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับน้ำมันจากพืชที่สามารถผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเกิดความสนใจในการคัดเลือกยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตไขมันสูงจากแหล่งธรรมชาติและสามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงและมีศักยภาพในการผลิตไขมันได้ในสถานะที่มีอุณหภูมิสูง โดยคาดว่าไขมันที่ได้สามารถเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้

วิธีการวิจัย

1. การคัดเลือกยีสต์

ทำการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตไขมันโดยคัดเลือกจากของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร ดังนี้ น้ำอ้อยคั้นที่เริ่มเน่า ลูกแป้งสาโท ฟางข้าว และกากถั่วเหลืองจากโรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลือง นำตัวอย่างเดิมลงไปในอาหาร Selective YPG medium (g/l: glucose 20, peptone 10, yeast extract 10 และ ampicilin 500 U) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการเกลี่ยเชื้อ (spread plate) บนอาหารแข็ง Selective YPG agar (glucose 20 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตร, yeast extract 10 กรัม/ลิตร, agar 15 กรัม/ลิตร และ ampicilin 500 U) แล้วบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (วิเชียรและคณะ, 2544-2545; Zhu et al, 2008) คัดเลือกยีสต์ที่มีโคโลนีเดี่ยวเพื่อจำแนกชนิด

การ

เก็บรักษายีสต์ที่ได้จากการคัดเลือกทำโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPG agar ผิวหน้าเอียงประกอบด้วย glucose 20 กรัม/ลิตร, yeast extract 10 กรัม/ลิตร, peptone 10 กรัม/ลิตรและวุ้น 15 กรัม/ลิตร

2. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

ทำการทดลองโดยการนำยีสต์ที่ได้จากการคัดแยกมาทดสอบโดยเพาะเลี้ยงใน YPG broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร YPG Agar ในจานเพาะเชื้อ โดยการหยดตัวอย่างเชื้อ 20 μ l ลงบนอาหาร (drop plate) โดยแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส บ่มในตู้บ่มนาน 48 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของโคโลนีเพื่อเปรียบเทียบในแต่ละอุณหภูมิ

3. การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ในสถานะอุณหภูมิสูง

ทำการเลี้ยงยีสต์ในอาหารสูตร Production medium ซึ่งประกอบด้วย น้ำเชื่อมมันเทศ (มันเทศที่ขูดด้วยเอนไซม์) หรือ กลีเซอรอล 20 กรัม/ลิตร, yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร, peptone 1.8 กรัม/ลิตร, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 2.0 กรัม/ลิตร, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.003 กรัม/ลิตร และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0001 กรัม/ลิตร ปรับ pH เป็น 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8 วัน

4. การสกัดและวัดปริมาณไขมันด้วยวิธี colorimetric method

เตรียมสารละลาย copper reagent โดยนำ Cupric acetate 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับ pH เป็น 6.1 ด้วย pyridine เตรียมสารละลาย 1.5 M KOH และสารละลาย 2.5 M HCl เตรียมเซลล์แขวนลอยของยีสต์ 0.1 กรัม/มล. จากนั้นนำเซลล์แขวนลอย 1 มล. มาใส่ในหลอดจุกเกลียวขนาด 20 มล. เติม 1.5 M KOH 4 มล. ปิดจุกให้แน่นต้มให้เดือด 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นลง เติม 2.5 M HCl 6 มล. และ Isooctane 5 มล. เขย่าอย่างแรง 200-300 ครั้ง/นาที เพื่อนำไปสกัดไขมันอิสระออกมาอยู่ในชั้นของ Isooctane

จ า ก นั้ น ปิ เป ต

สารละลายสกัดไขมันจากยีสต์ (สกัดลิปิดจากเซลล์จุลินทรีย์) มา 3 มล. ทำปฏิกิริยากับ copper reagent 1 มล. ปิดจุกเขย่าอย่างแรงๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้ สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ผลและสรุปผลวิจัย

1. ผลจากการคัดเลือกยีสต์

การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันในงานวิจัยนี้คัดเลือกมาจากของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตร โดยมีตัวอย่างที่นำมาคัดเลือกมีทั้งหมด 5 แหล่ง คือ ฟางข้าวแห้ง กากถั่วเหลือง (ที่ได้จากกระบวนการทำนมถั่วเหลือง) ลูกแป้งสาโท และน้ำอ้อยคั้นที่เริ่มเน่า โดยการนำตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPG บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมาเกลี่ยบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาคัดแยกเอายีสต์ที่มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว ซึ่งสามารถคัดเลือกยีสต์ได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ

แหล่งตัวอย่าง	สายพันธุ์ยีสต์ที่พบ
ฟางข้าวแห้ง (Rc)	Rc 01, Rc 02, Rc 03, Rc 04, Rc 05
กากถั่วเหลือง (Sbc)	Sbc 01, S Sbc 02, Sbc 03, Sbc 04, Sbc 05, Sbc 06, Sbc 07
ลูกแป้งสาโท (Yc)	Yc 01, Yc 01, Satho
น้ำอ้อยเริ่มเน่า (Scj)	Scj 01, Scj 02, Scj 03, Scj 04, Scj 05, Scj 06, Scj 07, Scj 08, Scj 09, Scj 10, Scj 11, Scj 0A, Scj 0B, Scj 0C, Scj 0D, Scj 0E, Scj 0F, Scj 0G, Scj 0H, Scj 0I, Scj 0J, Scj 0K

จากการคัดแยกยีสต์จากจากตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลท ซึ่งทั้ง 37 ไอโซเลทสามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าเป็นยีสต์โดยการทดสอบเบื้องต้น โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเซลล์ของทั้ง 37 ไอโซเลท เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แล้วมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ยีสต์ เช่น เซลล์มีขนาดใหญ่ มีการแตกหน่อ

2. ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้

การ

ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไบโอมันของยีสต์เพื่อหายีสต์สะสมไบโอมันที่สามารถเจริญและสะสมไบโอมันได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงโดยการแปรผันอุณหภูมิในการทดสอบคือ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส โดยในการทดสอบนี้ จะคัดเลือกเอาเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิสูง ซึ่งการทดลองนี้ พบว่า ยีสต์บางไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีเพียงสายพันธุ์เดียวที่เจริญในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสแต่มีการเจริญเพียงเล็กน้อย จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่สูงที่สุดที่เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกไว้สามารถเจริญได้ โดยจากการทดลองได้ผลการทดลองดังนี้

2.1

ยีสต์ที่คัดเลือกได้จากน้ำอ้อยคั้นที่เริ่มเน่า ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส มีอยู่ 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท Scj 01, Scj 11, Scj 0A, Scj 0E

2.2 ยีสต์ที่คัดเลือกได้จากน้ำอ้อยคั้นที่เริ่มเน่า ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส มีอยู่ 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท Scj 0E

2.3 ยีสต์จากกากถั่วเหลือง, ฟางข้าว และลูกแป้ง มีอย่างละ 1 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส รวมเป็น 3 ไอโซเลท ดังนี้ ไอโซเลท Sbc 06, Rc 03, Yc 02

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร) ของยีสต์ที่หมักที่เจริญในอุณหภูมิต่างๆ โดยการทดสอบด้วยวิธีการหยดเชื้อลงบนอาหารแข็ง (drop plate techniques)

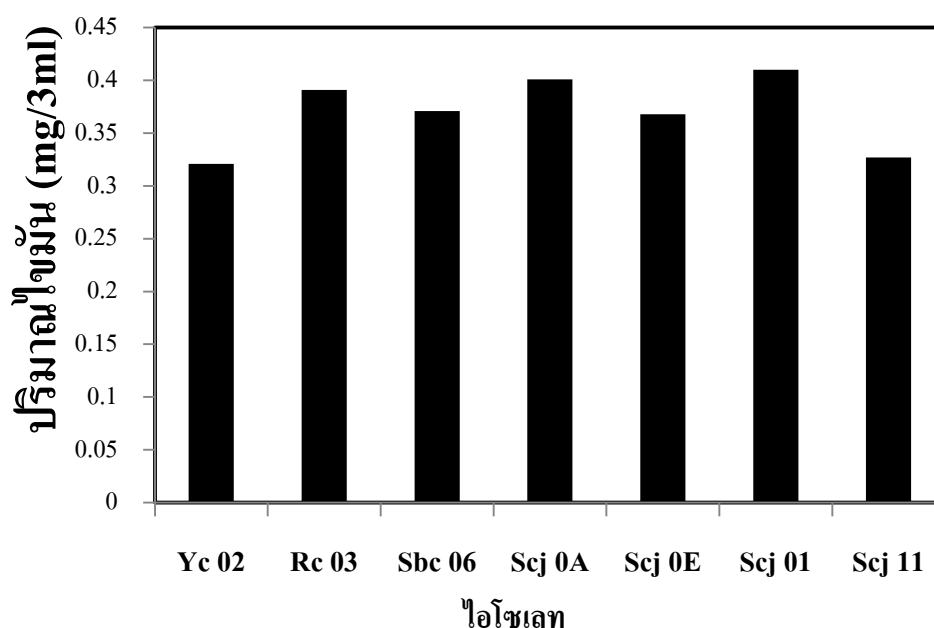
ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)			
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
Scj 01	1.45	2.03	2.25	ไม่เจริญ
Scj 11	1.45	1.45	1.50	ไม่เจริญ
Scj 0A	1.20	1.43	1.45	ไม่เจริญ
Scj 0E	2.50	1.9	1.55	1.03
Sbc 06	1.13	1.30	1.4	ไม่เจริญ
Rc 03	1.18	1.38	1.43	ไม่เจริญ
Yc 02	1.20	1.38	1.4	ไม่เจริญ

จากตารางที่ 2 สามารถสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลท Sbc 06, Rc 03, Scj 01, Scj 11, Scj 0A และ Yc 02 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิดังกล่าวจะมีขนาดของโคโลนีที่ใหญ่กว่าอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้นเชื้อไอโซเลท Scj 0E ที่มีขนาดของโคโลนีที่ใหญ่ที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิสูงที่ 40 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อ Scj 0E ก็ยังสามารถเจริญได้ดีใกล้เคียงกับเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลทข้างต้นจึงถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่เจริญสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้เช่นกัน ซึ่งรวมทั้งสิ้นสามารถได้ยีสต์ที่สามารถทนอุณหภูมิสูง จำนวน 7 ไอโซเลท ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิสูงในงานวิจัยนี้

3. การทดสอบการสะสมไขมันของยีสต์ในสภาวะอุณหภูมิสูง

การเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อศึกษาการสะสมไขมันของยีสต์ที่คัดแยกได้จะทดสอบเฉพาะยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 7 ไอโซเลท โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไขมันด้วยวิธี Colorimetric method ตามวิธีของ Dae และ Joon (1986) ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไขมันจากยีสต์สะสมไขมันได้ผลดังรูปที่ 1 และสามารถสรุปได้ว่ายีสต์ทั้ง 7 ไอโซเลทสามารถสะสมไขมันได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส โดยยีสต์ไอโซเลท Scj 01 สามารถผลิตไขมันได้ 0.410 mg/3ml ซึ่งสูงกว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์อื่น และยีสต์สายพันธุ์ Scj 01 ยังสามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้และสามารถผลิตไขมันได้ 0.452 mg/3ml

รูปที่ 1 แสดงปริมาณไขมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสที่มีน้ำเชื่อมมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอน



จากผลการทดลองข้างต้นเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตและการสะสมไขมันของยีสต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 ไอโซเลท เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งการสะสมไขมันของจุลินทรีย์หรือการผลิตไขมันเซลล์เดียวจะดีหรือไม่นั้นต้องขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญและสภาวะการผลิตไขมันที่เหมาะสมด้วย ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมประกอบด้วยกันหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมีซึ่งควรมีการศึกษาปัจจัยเหล่านี้ให้เหมาะสมกับการสะสมและการผลิตไขมันเซลล์เดียวเพื่อให้ได้ผลได้ (yield) สูงที่สุด

อภิปรายผล

จากการคัดแยกยีสต์จากน้ำอ้อยคั้นที่เริ่มเน่า, ลูกแป้งสาโท, ฟางข้าวแห้ง และกากถั่วเหลืองที่เป็นของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลท และจากการทดสอบยีสต์ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูง พบว่า ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีการเจริญเพียงเล็กน้อย โดยยีสต์ที่คัดเลือกได้ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงมีด้วยกันทั้งหมด 7 ไอโซเลท ดังนี้ Yc 02, Rc 03, Sbc 09, Scj 0A, Scj 0E, Scj 01 และ Scj 11 การที่ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสซึ่งถือว่าเป็นยีสต์ทนร้อน โดยส่วนใหญ่แล้วยีสต์จะสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียสเมื่อมีอุณหภูมิสูงที่ 40 องศาเซลเซียสจะมีแค่ยีสต์บางสายพันธุ์เท่านั้นที่จะสามารถเจริญได้ดี จากนั้นนำยีสต์ทนร้อนทั้ง 7 ไอโซเลทไปทดสอบการสะสมไขมันหรือการผลิตไขมันเซลล์เดียวในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงโดยมีน้ำเชื่อมมันเทศที่ย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า ยีสต์ทั้ง 7 ไอโซเลท มีปริมาณไขมัน (0.321, 0.391, 0.371, 0.401, 0.368, 0.410 และ 0.327 mg/3ml ตามลำดับ) โดยยีสต์ไอโซเลท Scj 01 สามารถผลิตไขมันได้สูงกว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์อื่น และยีสต์ไอโซเลท Scj 01 สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยสามารถสะสมไขมันได้ที่ 0.452 mg/3ml ดังนั้นยีสต์ทั้ง 7 ไอโซเลท สามารถสะสมไขมันได้ในสภาวะอุณหภูมิสูง โดยงานวิจัยทั่วไปส่วนใหญ่จะศึกษาการสะสมไขมันของยีสต์ที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันกับ รัตนภรณ์, 2551 ที่ศึกษาการสะสมไขมันของยีสต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ Pan et al, 2008 ที่ศึกษาการสะสมไขมันของยีสต์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองข้างต้นเป็นส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์ที่จะมีการนำไปทดลองต่อไปโดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันที่ทนอุณหภูมิสูง เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของเชื้อยีสต์แต่ละไอโซเลทในการสะสมไขมัน โดยการที่จะให้ยีสต์สามารถสะสมและผลิตไขมันได้สูงนั้นควรทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการสะสมและผลิตไขมัน ทั้งปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์

รายการอ้างอิง

- รัตนภรณ์ ลีสิงห์. “ การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง.” วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 51, 36 (เมษายน-มิถุนายน 2551): 129-133.
- วิเชียร ขงมานิตชัยและคณะ. “ การคัดเลือกจุลินทรีย์ทนร้อนจากป่าชายเลนจังหวัดระนอง เพื่อการผลิตกรดไขมันโอเมกา-3 และกรดไขมันพิเศษ.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (2544-2545)
- Cuimin, H., Xin, Z., Siguo, W., and Zongbao, Z.K. “Effect of biomass hydrolysis by- Product on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. ”Journal of Bioresource technology, no. 100 (2009):4843-4847.
- Dae, Y. K., and Joon, S. R. “A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. ” JAOCS, no. 63(1986):89-92.
- Economou, Ch.N., Makri, A., Aggelis, G., Pavlou, S., and Vayenas, D.V. “Seme- Solid State fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil.” Journal of Bioresource technology, no. 100 (2009):1385-1388.
- Mei, L., Guang-Lei, Z.C., and Zhen-Ming C. “Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. ”Journal of Biomass and Bioenergy, no. 34 (2010):101-107.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., and Xian, M. “Biodiesel production from oleaginous microorganisms. ” Journal of Renewable Energy, no. 34 (2009):1-5.
- Pan, L.X., Yang, D.F., Shao, L., Li, L., Guang, G., and Liang, Z.Q. “ Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. ” Journal of Biotechnology, no. 47 (2009):215-220.
- Zhao, C.H., Zhang, T., Li, M., and Chi, Z.M. “Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. ” Journal of Process Biochemistry, no. 45 (2010):1121-1126.
- Zhu, L.Y., Zong, M.H., and Wu, H., and Liu, Q.P. “Microbial oil production from rice staw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. ” Journal of Bioresource technology, no. 100 (2009) : 4535-4538.
- Zhu, L.Y., Zong, M.H., and Wu, H. “Efficient lipid production with *trich* use for biodiesel preparation. ” Journal of Bioresource technology, no. 99 (2008):7881-7885.