รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์สะสมไขมันในอาหารที่เตรียมจากสารสกัดจากชานอ้อยเพื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. จันทรพร ทองเอกแก้ว

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สิงหาคม 2559

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์สะสมไขมันในอาหารที่เตรียมจากสารสกัดจากชานอ้อยเพื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

Production of microbial lipid by oleaginous yeast on sugarcane bagasse hydrolysate medium for biodiesel production

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. จันทรพร ทองเอกแก้ว

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2558

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติในการให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในการเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์สะสมไขมันในอาหารที่เตรียมจากสารสกัดจากชานอ้อยเพื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล” มีนางสาวจันทรพร ทองเอกแก้ว เป็นหัวหน้าโครงการ ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2558 เป็นจำนวนเงิน 297,000 บาท (สองแสนเก้าหมื่นเจ็ดพันบาทถ้วน) โดยเริ่มดำเนินการโครงการตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2557 และได้

เสร็จสมบูรณ์เมื่อ 31 กรกฎาคม 2559 ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ กล่าวคือ สามารถพบยีสต์จากแหล่งธรรมชาติที่สะสมไขมันในปริมาณสูง การผลิตลิปิดจากยีสต์ไขมันจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย และ รู้ชนิดและปริมาณของลิปิดที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมันเพื่อนำไปใช้เตรียมผลิตไบโอดีเซลสำหรับใช้เป็นพลังงานทางเลือกได้

บทคัดย่อ

จากการนำยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากดิน ดินปนเปื้อนคราบน้ำมัน และน้ำจากบ่อบำบัด ของโรงอาหารในบริเวณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจากตลาดวารินเจริญศรี จำนวน 93 ไอโซเลต มาคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันด้วยวิธีการย้อมสี Sudan black B พบว่ามียีสต์ทั้งหมด 60 ไอโซ-เลตที่ติดสีย้อมที่ไขมันภายในเซลล์ จากนั้นนำยีสต์ทั้ง 60 ไอโซเลตนี้มาเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตไขมันที่มี 7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และทำการสกัดไขมัน พบว่า มีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ยีสต์รหัส UBU-s7, UBU-s12, UBU-w4, UBU-w9/2 และ UBU-gt6/1 จัดเป็นยีสต์สะสมไขมัน เนื่องจากสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำยีสต์ 5 ไอโซเลตนี้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิปิดของเชื้อ พบว่า ยีสต์รหัส UBU-s7 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อยเริ่มต้นที่ 10% ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ให้ค่าลิปิด

เท่ากับ 1.51 กรัมต่อลิตร (29.03%) ยีสต์รหัส UBU-s12 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อยเริ่มต้นที่ 15% ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน ให้ค่าลิปิดเท่ากับ 1.20 กรัมต่อลิตร (27.90%) ยีสต์รหัส UBU-w4 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 2.5-10% ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ให้ค่าลิปิดเท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร (29.14%) ยีสต์รหัส UBU-w9/2 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 5-10% ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน ให้ค่าลิปิดเท่ากับ 1.15 กรัมต่อลิตร (26.92%) และยีสต์รหัส UBU-gt6/1 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 10-20% ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน ให้ค่าลิปิดเท่ากับ 1.18 กรัมต่อลิตร (27.44%) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปิดโดยแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักเป็นสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม โดยมีปริมาณของกรดโอเลอิกมากที่สุด รองลงมาคือ กรดปาล์มิติก และกรดลิโนเลอิก ตามลำดับ ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันในลิปิดที่ยีสต์ผลิตได้นี้มีลักษณะเช่นเดียวกับองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันพืช ดังนั้นจากการศึกษานี้แสดงว่ายีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้สามารถผลิตน้ำมันที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบอีกแหล่งหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตไบโอดีเซล

Abstract

From a total of 93 yeast isolates were obtained from samples collected from soil, greasy soil and canteen waste water in Ubon Ratchathani University and spoilage fruit from warincharoensri market, a 60 yeast isolates were identified as potential lipid producers by applying Sudan Black B tests. A total of 60 yeast isolates were further cultivated in production medium containing 7% glucose as a carbon source and measured lipid containing in cell by lipid extraction. Among these 60 isolates, 5 isolates namely UBU-s7, UBU-s12, UBU-w4, UBU-w9/2 and UBU-gt6/1 were identified as oleaginous yeasts which exhibited content of lipid in cell over 20% of cell dry weight. A 5 yeast isolates were further investigated on lipid production by cultivated in a medium containing sugarcane bagasse hydrolysate. It was found that UBU-s7 accumulated a high lipid production of 1.51 g/L (29.03%) when it was cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate at the initial content of 10%, pH 6.5 for 5 days of cultivation. UBU-s12 accumulated a high lipid production of 1.20 g/L (27.90%) when it was cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate at the initial content of 15%, pH 6.0 for 6 days of cultivation. UBU-w4 accumulated a high lipid production of 1.37 g/L (29.14%) when it was cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate at the initial content of 2.5-10%, pH 6.0 for 5

days of cultivation. UBU-w9/2 accumulated a high lipid production of 1.15 g/L (26.92%) when it was cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate at the initial content of 5-10%, pH 6.5 for 7 days of cultivation. UBU-gt6/1 accumulated a high lipid production of 1.18 g/L (27.44%) when it was cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate at the initial content of 10-20%, pH 6.0 for 5 days of cultivation. Gas chromatography analysis revealed that lipids from all 5 isolated contained mainly long-chain fatty acids with 16 and 18 atoms which exhibited the higher content of oleic acid, palmitic acid and linoleic acid, respectively. The three major constituent fatty acids are similar to fatty acids in vegetable oil. Thus, this results show that the isolated yeasts could produce lipid that could be promising candidates for biodiesel production.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	III
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	VI
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	2
บทที่ 3 วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	15
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	35
- ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ และ สารเคมี	36
- ภาคผนวก ข การคำนวณปริมาณปริมาณน้ำตาลในสารสกัดชานอ้อย	38
- ภาคผนวก ค การคำนวณปริมาณไขมัน	40
- ภาคผนวก ง บทความสำหรับการเผยแพร่	41
- ภาคผนวก จ ตารางเปรียบเทียบ กิจกรรมที่วางแผนไว้	47

กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ
- ภาคผนวก ฉ ประวัติผู้วิจัย 48

สารบัญตาราง

หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณการสะสมไขมันที่สกัดจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ 15
ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดแยกได้ 28

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ชานอ้อย 5
ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้ 5 สายพันธุ์ 18
ภาพที่ 3 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s7 19
ภาพที่ 4 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s12 20
ภาพที่ 5 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w4 20
ภาพที่ 6 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w9/2 21
ภาพที่ 7 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-gt6/1 21
ภาพที่ 8 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิด ของยีสต์รหัส UBU-s7 22
ภาพที่ 9 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิด ของยีสต์รหัส UBU-s12 23
ภาพที่ 10 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิด ของยีสต์รหัส UBU-w4 23
ภาพที่ 11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิด ของยีสต์รหัส UBU-w9/2 24
ภาพที่ 12 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิด ของยีสต์รหัส UBU-gt6/1 24
ภาพที่ 13 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s7 25
ภาพที่ 14 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s12 26
ภาพที่ 15 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w4 26
ภาพที่ 16 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w9/2 27
ภาพที่ 17 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-gt6/1 27

บทที่ 1
บทนำ

จากปัญหาด้านสถานการณ์ราคาน้ำมันปิโตรเลียมในตลาดโลกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้รัฐบาลและประชาชนทั่วไปให้ความสนใจพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือกมากขึ้น โดยเฉพาะการผลิตพลังงานชีวภาพ เช่น ไบโอดีเซล (biodiesel) ปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมัน เช่น สบู่ดำ และปาล์มน้ำมันในประเทศมีมากขึ้น จึงมีความต้องการพืชน้ำมันจำนวนมาก แต่ผลผลิตของพืชน้ำมันในประเทศมีจำกัด จึงเกิดปัญหาราคาของวัตถุดิบของพืชน้ำมันที่มีราคาสูง ส่งผลให้การผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมันมีต้นทุนสูงตามไปด้วย ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มแนวทางในการเพิ่มปริมาณน้ำมันให้เพียงพอกับความต้องการใช้พลังงานชีวภาพนี้ การผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ (microbial oil) โดยจุลินทรีย์สะสมไขมัน (oleaginous microorganism) นับเป็นวัตถุดิบอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการใช้ทดแทนหรือร่วมกับน้ำมันจากเมล็ดพืชเพื่อผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สามารถทำได้ตลอดปี เจริญเร็ว ใช้พื้นที่น้อย สามารถควบคุมการผลิตและใช้วัตถุดิบราคาถูกเป็นสารอาหารได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาการผลิตลิปิด (น้ำมัน) จากยีสต์สะสมไขมันสูงที่คัดเลือกได้ และได้ประยุกต์ใช้ชานอ้อยที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากการกระบวนการผลิตน้ำตาลมาเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการเจริญเติบโต เพื่อนำลิปิดที่ผลิตได้ไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งเป็นการนำของเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ งานวิจัยนี้จึงให้ประโยชน์ทั้งทางด้านการการเพิ่มผลผลิตของน้ำมันที่จะนำไปใช้ทำเชื้อเพลิงชีวภาพ การลดต้นทุนการผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์จากการใช้อาหารสำเร็จรูปที่มีราคาสูง และการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากของเหลือใช้ที่มีปริมาณมาก โดยการวิจัยจะดำเนินการศึกษาการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันสูง วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย จากนั้นศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตลิปิดของยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารที่เตรียมจากสารสกัดจากชานอ้อย เพื่อให้ได้สภาวะที่เชื้อสามารถผลิตลิปิดได้ในปริมาณที่มากที่สุด และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันที่ยีสต์ผลิตได้เพื่อพิจาณาถึงความเป็นไปได้ของชนิดของกรดไขมันที่จุลินทรีย์ผลิตได้สำหรับนำไปใช้ในการเตรียมการผลิตเป็นไบโอดีเซลต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันสูง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตลิปิดของยีสต์ที่คัดแยกได้ในสารสกัดจากชานอ้อยที่เตรียมได้

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

2.1 ลิปิด (Lipid)

ลิปิดเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ (Water-insoluble หรือ Hydrophobic) แต่ละลายได้ดีในสารละลายไม่มีขั้ว (Non polar solvents) หรือ ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvents) เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เบนซิน อะซิโตน เอธานอล และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ เป็นต้น ลิปิดได้แก่ ไขมัน (Fat) และน้ำมัน (Oil) รวมทั้งสารอื่นๆ ที่มีองค์ประกอบทางเคมีหรือมีลักษณะทางกายภาพคล้ายไขมัน (นิธิยา, 2541)

2.1.1 โครงสร้างและสมบัติของลิปิด

ลิปิดเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์ของแอลกอฮอล์กับกรดไขมัน (fatty acid) มีโครงสร้างโดยทั่วไป คือ จะมีส่วนของโครงสร้างที่เป็นไฮโดรคาร์บอน (CH) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว (non-polar) มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ลิปิดบางชนิดอาจประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (polar) มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ทำให้ลิปิดเหล่านี้มีคุณสมบัติทั้งชอบน้ำและไม่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุล เรียกคุณสมบัติแบบนี้ว่า แอมฟิไฟด์ (amphiphiles) (เป็นภาษากรีกแปลว่า ชอบทั้งคู่) ลิปิดเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่ทำให้ลิปิดที่ไม่ละลายน้ำสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ ลิปิดที่มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิไฟด์ ได้แก่ ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) และสฟิงโกลิปิด (sphingolipid)

2.1.2 การจำแนกประเภทของลิปิด เราสามารถจำแนกลิปิดตามลักษณะของการทำหน้าที่ ได้แก่

2.1.2.1 ลิปิดที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน ได้แก่ กรดไขมัน (fatty acid) ไข (waxes) และไตรเอซิลกลีเซอรอล

2.1.2.2 ลิปิดที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเมมเบรน ได้แก่ ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) กลีเซอโรฟอสโฟลิปิด (glycerophospholipids) สเตอรอยด์ (steroids)

2.1.2.3 ลิปิดที่ทำหน้าที่อื่นๆ เช่น เป็นตัวให้สัญญาณ (signal) เป็นโคแฟคเตอร์ และสารสี (pigments) ได้แก่ ฟอสฟาทิดิลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) ไอโคซานอย (eicosanoi)

2.2 ลิปิดจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตน้ำมันได้ซึ่งน้ำมันที่ได้จากจุลินทรีย์ จะเรียกว่า น้ำมันเซลล์เดี่ยว (single cell oil) ส่วนใหญ่เป็นน้ำมันที่บริโภคได้ มีองค์ประกอบคล้ายกับนำมันจากพืช จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิปิดได้เรียกว่า จุลินทรีย์สะสมไขมัน (oleaginous microorganisms) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิปิดได้ มีทั้งยีสต์ รา สาหร่าย และแบคทีเรีย

2.2.1 สาหร่าย (Algae)

สาหร่ายเป็นแหล่งลิปิดที่ดีซึ่งสามารถผลิตลิปิดได้สูงถึงร้อยละ 85 โดยน้ำหนักแห้ง สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเจริญเติบโตช้า ต้องใช้แสงสว่างและพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง และปัญหาในการกำจัดคลอโรฟิลล์ออก อีกทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวสูง ไขมันที่ได้มีจำนวนคาร์บอน 12-22 อะตอมต่อโมเลกุล สาหร่ายหลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดไขมันที่มีคุณภาพสูง ใน *Porphylidium* sp. จะมีการสังเคราะห์ Arachidonic acid (C20:4) Linoleic acid (C18:2) Linolenic

acid (C18:3) Eicosapentaenoic acid (EPA) (C20:5) สามารถนำไขมันที่ได้ไปใช้เป็น Hyperlipidemia เพื่อลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดและใช้เพื่อการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ (Belarbi และคณะ 2000)

2.2.2 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถเลี้ยงได้ในถังหมักแต่จะให้ปริมาณเซลล์และไขมันต่ำเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ องค์ประกอบของกรดไขมันมีความซับซ้อนซึ่งยุ่งยากต่อการสกัด และมีแนวโน้มก่อให้เกิดโรคหรือมีสารพิษปนกับไขมันที่ได้ จึงไม่นิยมผลิตไขมันจากแบคทีเรีย การผลิต Docosahexaneenoic acid (DHA) จากแบคทีเรียนับว่าน่าสนใจอย่างยิ่ง เพราะสามารถนำเทคโนโลยีชีวภาพที่ทันสมัยมาช่วยในการผลิตได้ Yano และคณะ (1994) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาทะเลน้ำลึกที่สามารถผลิต DHA ได้ถึง 5 สายพันธุ์ โดยจะให้การผลิต DHA ร้อยละ 6.4 -11.6 ของกรดไขมันทั้งหมด หรือประมาณ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร Yazawa และคณะ (1988) คัดเลือกได้แบคทีเรียแกรมลบ รหัส SCRC-8132 สามารถผลิต EPA ได้เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียสและถ้าเลี้ยงที่ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้ EPA เพิ่มขึ้นร้อยละ 40 ของไขมันทั้งหมด (Hammond และ Glatz, 1988)

2.2.3 ราและยีสต์ (Moulds and Yeasts)

ราและยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตลิปิดได้ น้ำมันที่ได้ส่วนใหญ่จะมีจำนวนคาร์บอนเป็น 16 และ 18 อะตอมซึ่งเหมือนกับน้ำมันจากพืช แต่ต่างกันที่การจัดเรียงตัวของกรดไขมันในองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ Shimizu และคณะ (1988) พบว่ารา *Mrtierella alpine* 20-17 เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิต EPA ได้เท่ากับ 29 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ที่ 12 องศาเซลเซียส และ Shirasaka และ Shimizu (1995) ได้ศึกษารา *Saprolegnia sp.* 28YTE-1 ที่แยกจากน้ำ พบว่ารานี้สามารถผลิตกรด Eicosapentanoic acid (EPA) และกรด Arachidonic acid (AA) ได้ โดยสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น แป้ง เดกซ์ทริน น้ำตาลทราย น้ำตาลกลูโคส และน้ำมันมะกอก โดยที่น้ำมันมะกอกจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสามารถใช้ผลิต EPA ได้ 17 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์แห้ง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 20 องศาเซลเซียส

งานวิจัยการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ ทำการศึกษาในสาหร่ายขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ผลิตน้ำมันเพื่อนำไปผลิตไบโอ-ดีเซล เนื่องจากยีสต์สามารถเพาะเลี้ยงได้ในแหล่งคาร์บอนราคาถูกได้หลากหลายและเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่าย และไขมันที่ได้ไม่มีปัญหาสารพิษปนเปื้อน ซึ่งนับว่าเป็นข้อได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีแนวโน้มในการวิจัยการผลิตลิปิดจากยีสต์เพื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมากขึ้น (Xue และคณะ 2006 และ 2008)

2.3 ยีสต์สะสมไขมัน (Oleaginous Yeasts)

ยีสต์ที่สามารถผลิตและสะสมไขมันได้สูงกว่า 20% โดยน้ำหนักแห้ง เรียกว่า ยีสต์ไขมันสูง หรือยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeast) โดยยีสต์จะมีการผลิตไขมันและสะสมไขมันในรูปหยดน้ำมันเล็กๆ (microdroplet oils) ภายในเซลล์ของยีสต์ ตัวอย่างสายพันธุ์ยีสต์สะสมไขมัน เช่น *Candida* 107, *Kodamaea ohmeri, Trichosporonoides spathulata, Cryptococcus curvatus, Rhodotorula glutinis, Rhodosporidium toruloides, Lipomyces starkeyi* และ *Yarrowia lipolytica* (Gill และคณะ 1977; Meesters และคณะ 1996; Li และคณะ 2007) มักพบการสะสมไขมันเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเกินพอ และจำกัดปริมาณสารอาหารอื่นๆที่มีผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์จุลินทรีย์

(รัตนภรณ์, 2551) ชนิดและปริมาณของไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ สารอาหาร และสภาวะต่างๆที่ใช้ในการเลี้ยง เช่น พีเอช และ อุณหภูมิ เป็นต้น

ชนิดของไขมันที่พบในยีสต์สะสมไขมัน ได้แก่

2.3.1 ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol)

ไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล เป็นผลผลิตหลักที่อยู่ในรูปหยดไขมันเล็กๆภายในเซลล์ต้องทำให้เซลล์แตกก่อนจึงสกัดออกมาได้ กรดไขมันในไตรเอซิลกลีเซอรอล ที่พบในยีสต์นั้นจะมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-24 อะตอม โดยชนิดที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอมจะพบมากที่สุด มีทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว

2.3.2 ฟอสโฟลิปิด (phospholipid)

ฟอสโฟลิปิดเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล และมีหมู่กรดฟอสฟาติคเป็นส่วนสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เมมเบรน ฟอสโฟลิปิดในยีสต์มักเป็นฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidyl choline) เป็นส่วนใหญ่ (ร้อยละ 25-35 ของฟอสโฟลิปิดทั้งหมด)

2.3.3 สฟิงโกลิปิด (sphingolipid)

สฟิงโกลิปิดเป็นไขมันที่มีสายยาว (long chain base) สฟิงโกลิปิดแบ่งออกเป็น 3 ชนิดด้วยกันคือ สฟิงโกไมอีลิน (sphigomyelin) เซเรโบรไซด์ (cerebrosides) และแกงกลิโอไซด์ (gangliosides) ในยีสต์พบเฉพาะเซเรโบรไซด์สฟิงโกลิปิด และจะอยู่รวมกับสารประกอบอื่นๆในรูปไกล-คอล (glycol) และอินโนสิทอล ฟอสฟอริลสฟิงโกลิปิด (inositol phosphorylsphingolipids) (Meesters และคณะ 1996; Li และคณะ 2007)

2.4 ชานอ้อย

ชานอ้อยคือส่วนของลำต้นอ้อยที่หีบเอาน้ำอ้อยหรือน้ำตาลออกแล้ว แสดงดังภาพที่ 1 ประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และน้ำตาลซูโครส ดังนั้นเมื่อนำชานอ้อยมาสกัดด้วยกรดจะทำให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตแทนน้ำตาลอาหารสำเร็จรูปได้ จึงเป็นการลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการซื้อน้ำตาลสำหรับเลี้ยงเชื้อจากอุตสาหกรรม และยังได้นำเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อีกทางหนึ่งด้วย

ภาพที่ 1 ชานอ้อย

ที่มา : http://www.bansuanporpeang.com/node/15846

2.5 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือ การเปลี่ยนไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีอยู่ในน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ใช้แล้ว ให้เป็นโมโนอัลคิลเอสเตอร์ (mono alkyl ester) ได้แก่ เมทิลเอสเตอร์ (methyl ester) หรือเอทิลเอส-เตอร์ (ethyl ester) และกลีเซอรีน (glycerin) ผ่านกระบวนการ Transesterification โดยการเติมแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือเอทานอล และตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโปแตสเซียม-ไฮดรอกไซด์ ภายใต้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม จากนั้นทำการกำจัดยางเหนียวและสิ่งสกปรกออก สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลได้ เราเรียกเอสเตอร์ดังกล่าวนี้ว่า ไบโอดีเซล หรือ B100 ส่วนกลีเซอรีนที่ได้จากการผลิตถือเป็นผลพลอยได้ นำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง และน้ำมันหล่อลื่น เป็นต้น (กองบรรณาธิการเทคนิค เครื่องกลไฟฟ้าอุตสาหกรรม, 2548)

2.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รัตนภรณ์ ลีสิงห์ และงามนิจ นนทโส 2554 การคัดเลือกยีสต์จากตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันที่เก็บในพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่นระหว่างฤดูฝนด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ยีสต์ทั้งสิ้น 69 ไอโซเลต โดย 10 ไอโซเลต จัดเป็นยีสต์ไขมันสูงเนื่องจากสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่ายีสต์ไอโซเลต OYS3 เจริญและสะสมลิปิดสูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำโดยให้ปริมาณเซลล์ 7.9 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ 0.258 ต่อวัน ปริมาณลิปิดร้อยละ 52.7 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 90 กรัมต่อลิตร ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ที่ pH 5.0 ระยะเวลา 8 วัน การจัดจำแนกยีสต์ OYS3 โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA จัดเป็น *Candida viswanathii* ผลการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะพบว่าให้ปริมาณเซลล์ 9.11 กรัมต่อลิตร ปริมาณลิปิดร้อยละ 59.50 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนอื่นพบว่ายีสต์ *C. viswanathii* OYS3 เจริญได้ดีในกลีเซอรอลและกากน้ำตาลโดยให้เซลล์ 7.8, 7.1 กรัมต่อลิตร และปริมาณลิปิดร้อยละ 37.2 และ 39.4 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปิดที่สกัดได้จาก *C. viswanathii* OYS3 ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าเป็นกรดไขมันชนิดสายยาวโดยมีกรดปาล์มิติก กรดสเตียริก และกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืชซึ่งมีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้

Kitcha และคณะ (2011) รายงานการคัดแยกยีสต์สะสมไขมันจากยีสต์จำนวนวน 889 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินและของเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและโรงงานผลิตไบโอดีเซลในภาคใต้ของประเทศไทย โดยใช้น้ำตาลกลูโคสหรือกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่สภาวะความเป็นกรด (pH 4.0) หรือเป็นกลาง (pH 6.0) กับ 0.0001% chloramphenicol และทดสอบด้วยการย้อมสี Sudan Black B พบยีสต์ทั้งหมด 23 สายพันธุ์ที่เป็นยีสต์สะสมไขมัน จากนั้นนำทั้ง 23 สายพันธุ์นี้มาทดสอบในอาหารที่มีกลีเซอรอลหยาบพบว่า BY4-523 และ JU4-57 สะสมไขมันสูงถึง 53.28% และ 41.50% ตามลำดับ จากนั้นนำไปจัดจำแนกพบว่า BY4-532 คือ *Kodamaea ohmeri* และ JU4-57 คือ *Trichosporonoides spathulata* ตามลำดับ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนทีเป็น Yeast extract กับ Peptone ในอัตราส่วน 1:1 พบว่า *T. spathulata* ให้ค่าชีวมวลที่ 17.05 กรัมต่อลิตร และการผลิตไขมันอยู่ที่ 10.43 กรัมต่อลิตร ส่วน *K. ohmeri* ให้ค่าชีวมวลอยู่ที่ 11.1 กรัมต่อลิตร และการผลิตไขมันที่ 4.53 กรัมต่อลิตร สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟตให้การผลิตไขมันของ *T. spathulata* และ *K. ohmeri* อยู่ที่ 3.85 และ 3.17 กรัมต่อลิตร ให้ค่าชีวมวลอยู่ที่ 9.17 และ 10.45 กรัมต่อลิตร เนื่องจากแอมโมเนียมซัลเฟต มีราคาถูกจึงถูก

เลือกที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมและกลีเซอรอลคือ 0.5% และ 10% ตามลำดับ พบว่า *T. spathulata* ให้ชีวมวลและไขมันอยู่ที่ 10.40 และ 4.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *K. ohmeri* ให้ชีวมวลและไขมันอยู่ที่ 10.50 และ 3.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Liang และคณะ (2012) รายงานการใช้ชานข้าวฟ่างมาปรับสภาพที่ lime doses 3 ระดับ ได้แก่ 0, 0.05 และ 0.1 กรัมต่อกรัมชานข้าวฟ่าง ในน้ำ 7 หรือ 10 มิลลิลิตรต่อกรัมชานข้าวฟ่าง ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่า ในสภาวะของการปรับสภาพนี้ทำให้เกิดการย่อยสลาย ลิกนิน และ ไซแลน และพบว่า ที่สภาวะที่ปรับด้วย lime doses 0.1 กรัมต่อกรัมชานข้าวฟ่าง ที่มีปริมาณน้ำ 10 มิลลิลิตรต่อกรัมชานข้าวฟ่าง และต้มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำตาลรวมเท่ากับ 44.6 กรัมน้ำตาลรวมต่อ100 กรัมชานข้าวฟ่าง เทียบเท่ากับ 73.6% ของน้ำตาลที่มีอยู่ในไฮโดรไลเซต ทำให้ *Cryptococcus curvatus* เจริญได้ดีโดยให้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ใน 5 วัน และให้ปริมาณไขมันที่เป็นกลาง 2.6 กรัม ในวันที่ 3 โดยไขมันที่เป็นกลาง ได้เท่ากับ 0.19 (กรัมไขมันเป็นกลางต่อกรัมน้ำตาล) ซึ่งใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี ดังนั้นจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ชานข้าวฟ่างที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งการเกษตรมาเปลี่ยนให้เป็นไขมันเพื่อผลิตเป็นไบโอดีเซลได้

Chen และคณะ (2013) ศึกษาผลขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไขมัน พบว่าน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และน้ำตาลเซลโลไบโอส มีผลต่อการเจริญและการผลิตไขมันของยีสต์ *Trichosporon cutaneum* แต่การเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหาร พบว่าไม่มีผลต่อการผลิตไขมัน และเมื่อศึกษาการเติม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ และ KCl (ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็น 0.3, 3.0×10^{-3}, 3.0×10^{-3} และ 0.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ความเข้มข้นของเชื้อ 5% อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า pH เท่ากับ 6 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *T. cutaneum* ให้ค่าชีวมวลและการผลิตไขมัน มีค่าเท่ากับ 22.9 กรัมต่อลิตร และ 45.4% ตามลำดับ

Tanimura และคณะ (2013) รายงานการศึกษาการคัดแยกยีสต์สะสมไขมันจากยีสต์ที่แยกได้ในประเทศญี่ปุ่นจำนวน 500 สายพันธุ์ พบว่ามีจำนวน 31 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพผลิตไขมัน จากนั้นนำ 12 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 3% พบว่า JCM 24511 สะสมไขมันสูงสุดถึง 61.53% และจัดจำแนกเป็น *Cryptococcus musci* ในขณะที่ JCM 24512 เติบโตเร็วที่สุด และจำแนกว่า JCM 24512 เป็น *Cryptococcus* sp โดย JCM 24511 และ JCM 24512 ให้ปริมาณไขมันสูงสุด 1.49 กรัมต่อลิตร และ 1.37 กรัมต่อลิตร จากการทดสอบทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ พบว่า JCM 24512 มีการผลิตไขมันที่ดีที่สุดที่ 0.37 กรัมต่อลิตรต่อวัน ผลที่ได้นี้แสดงว่ายีสต์สายพันธุ์นี้มีแนวโน้มในการผลิตน้ำมันเพื่อไปใช้ในผลิตไบโอดีเซลต่อไป

Chang และคณะ (2015) การผลิตไบโอดีเซลจากเซลล์ไขมันสูง เป็นการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์ โดยยีสต์สะสมไขมันศึกษาโดยใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน มีสายพันธุ์ยีสต์ที่ผ่านการทดสอบคือ *Cryptococcus* sp. SM5S05 ที่มีการสะสมของไขมันภายในเซลล์ในระดับสูงสุด โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Yeast malt agar พบว่ามีปริมาณไขมันที่สะสมถึง 30% ของน้ำหนักแห้ง โดยการสะสมของไขมันที่เพิ่มมากนั้นจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน กล่าวคืออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นระหว่าง 60 – 90 จะให้ปริมาณของไขมันสูงสุด และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Cryptococcus* sp. SM5S05 ในอาหารที่ไฮโดรไลเซตซังข้าวโพด ที่มีระดับน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร จะให้ค่าชีวมวลแห้งและอัตราการผลิตของไขมันเพิ่มขึ้นมีปริมาณเท่ากับ 12.6 และ 7.6 กรัมต่อลิตร โดยกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มี 16 และ 18 อะตอม

ของคาร์บอน โครงสร้างของกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตจาก *Cryptococcus* sp. จะมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของน้ำมันพืชทั่วไป ผลการศึกษาพบว่าไขมันจุลินทรีย์จาก *Cryptococcus* sp. เป็นทางเลือกที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล และการไฮโดรไลเซตซังข้าวโพดถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันซึ่งจะสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ทำให้มีปริมาณวัตถุดิบทางด้านการเกษตรถูกผลิตขึ้นอย่างมากมาย จากการเพิ่มปริมาณของวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการผลิตมากขึ้น ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากมีวัตถุดิบเหลือใช้ในปริมาณมากถูกปล่อยทิ้งไว้ อีกทั้งการนำวัสดุเหลือทิ้งมาเพิ่มมูลค่าทางด้านการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ยังไม่มากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตไขมันจากยีสต์สะสมไขมันที่มีความสามารถในการใช้สารสกัดจากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกลับมาใช้ประโยชน์ และเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนในการในการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ เนื่องจากอาหารสำเร็จรูปมีราคาสูง และเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากของเหลือใช้ที่มีปริมาณมากด้วย

บทที่ 3
วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1วัสดุและอุปกรณ์

1. Autoclave
2. Hot air oven
3. pH meter
4. Incubator
5. Vortex
6. Water bath
7. Spectrophotometer
8. เครื่องชั่งสาร
9. หลอดทดลอง
10. ขวดเตรียมสาร
11. Pipette ขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร
12. Auto pipette และ tip
13. Plate
14. Loop
15. Beaker
16. Cylinder
17. ลูกยางดูด
18. Centrifuge
19. Eppendorf
20. Erlenmeyer flask
21. ขวดสีชา
22. กระดาษชั่งสาร
23. ช้อนตักสาร
24. ตะเกียงแอลกอฮอล์
25. กระดาษฟลอยส์
26. สำลี
27. แท่งแก้วคนสาร
28. Glass bead
29. สไลด์
30. กระจกปิดสไลด์

สารเคมี

1. 95% Ethanol
2. Glucose
3. Glycerol
4. Ammonium sulfate
5. Potassium Dihydrogen phosphate
6. Magnesium sulfate
7. Yeast extract
8. Malt extract
9. Agar
10. Casein peptone
11. Chloroform
12. Methanol
13. Sodium sulfate
14. Dinitrosalicylic acid (DNS)
15. Sulfuric acid
16. Sodium chloride
17. Malt extract
18. Dextrose
19. Sudan Black B
20. Safranin O
21. Xylene
22. Chloramphenicol
23. Sodium propionate
24. Potassium sodium tartrate
25. Sodium hydroxide

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์ด้วยเทคนิค Enrichment culture technique

เก็บตัวอย่างดิน ดินปนเปื้อนคราบน้ำมัน และน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนไขมันจากบ่อบำบัดในพื้นที่เขตมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจากตลาดวารินเจริญศรี จังหวัดอุบลราชธานี มาคัดแยกยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast-malt extract (YM) ที่ประกอบด้วย yeast extract, malt extract, peptone, glucose, sodium propionate และ chloramphenicol บ่มในตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการเกลี่ยเชื้อ (spread plate) บนอาหารแข็ง yeast-malt extract agar นำมาบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Zhu และคณะ, 2008) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกยีสต์ที่เจริญเติบโต จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast peptone dextrose agar (YPD) จำนวน 3 รอบ

เก็บรักษายีสต์ที่ได้จากการคัดเลือกไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar เพื่อรอการนำไปศึกษาต่อไป

3.2.2 การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันที่ติดสี Sudan Black B

นำตัวอย่างยีสต์ที่คัดแยกได้มาย้อมสี Sudan Black B โดยการเกลี่ยเชื้อบนแผ่นสไลด์ ผึ่งให้แห้ง และตรึงรอยเกลี่ยโดยนำสไลด์ผ่านเปลวไฟ หยดสารละลาย 0.3% Sudan Black B ผึ่งไว้อย่างน้อย 10 นาที จากนั้นจุ่มสไลด์ใน Xylene ยกขึ้นลงหลายๆ ครั้งแล้วซับให้แห้ง ย้อมด้วย 0.5% Safranin O

ประมาณ 10 วินาที ล้างด้วยน้ำประปา ซับให้แห้ง นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นไขมันลักษณะเป็นจุดสีน้ำเงินแกมดำหรือจุดดำในไซโตพลาสซึมสีชมพู

3.2.3 การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน

ทำการเลี้ยงยีสต์ในอาหารสูตร Production medium ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร yeast extract 0.5 กรัมต่อลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน (Li และคณะ 2006) จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ไปทำการสกัดไขมันและวิเคราะห์หาปริมาณไขมันที่ผลิตได้

3.2.4 การสกัดและวัดปริมาณไขมันด้วยวิธี lipid extraction (Folch และคณะ 1957)

นำเซลล์ยีสต์แห้ง ประมาณ 0.02 กรัม มาเติมสารผสมของ chloroform : methanol (2:1, v/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glass beads นำไปเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมสาร ประมาณ 3-4 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของสารละลายมาเติม 0.9% (w/v) NaCl ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมสาร ประมาณ 3-4 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้สารละลายแยกชั้น ดูดส่วนใสส่วนล่างมาเติมสารผสมของ 0.9% (w/v) NaCl : methanol (1:1, v/v) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร นำไปเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมสาร ประมาณ 3-4 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ดูดส่วนใสที่แยกชั้นส่วนล่างไปทำการระเหยสารสกัดใน อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดระเหยออกหมด นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณไขมันที่ยีสต์ผลิตได้ จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่

3.2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตลิปิดของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย

3.2.5.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยเชื้อยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ ที่ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร yeast extract 0.5 กรัมต่อลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร pH 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.5.2 การศึกษาผลของปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการเจริญและผลิตลิปิดของเชื้อ

นำชานอ้อยที่ล้างสะอาดแล้วในปริมาณเริ่มต้นร้อยละ 2.5, 5, 10, 15 และ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไปสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ภายใต้หม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น และนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนใสที่เตรียมได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาส่วนใส ตามวิธีการที่ปรับปรุงจาก Zhu และคณะ (2008) จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นา

โนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส จะได้สารสกัดจากชานอ้อยเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อต่อไป

นำสารสกัดจากชานอ้อยที่ปริมาณเริ่มต้นต่างๆมาเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อตั้งต้น 10% (v/v) นำไปบ่มในตู้บ่มเขย่า ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณลิปิดที่ยีสต์ผลิตได้โดยวิธี lipid extraction

3.2.5.3 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของเชื้อ

นำสารสกัดจากชานอ้อยในปริมาณเริ่มต้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.2.5.2 ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 จากนั้นปิเปตเชื้อตั้งต้น 10% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณลิปิดที่ยีสต์ผลิตได้โดยวิธี lipid extraction

3.2.5.4 การศึกษาผลของระยะเวลาในการบ่มที่มีต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของเชื้อ

นำสารสกัดจากชานอ้อยในปริมาณเริ่มต้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.2.5.2 ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร MgS_47H_2O 0.5 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.5.3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อตั้งต้น 10% (V/V) นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำไปหาปริมาณลิปิดที่ยีสต์ผลิตได้โดยวิธี lipid extraction

3.2.6 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีการ DNS (Miller และคณะ 1959)

นำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แช่ให้เย็นด้วยน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 โนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

3.2.7 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์

นำตัวอย่างยีสต์ 1 กรัม มาสกัดน้ำมันโดยวิธี Soxhlet extraction (Baker, 1984) โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ นำน้ำมันที่สกัดได้มาทำการไฮโดรไลซ์กรดไขมันและเติมหมู่เมธิลโดยเติมคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร และไดเอธิลอีเทอร์ 3 มิลลิลิตรลงในสารละลายน้ำมันและนำไประเหยที่อุณหภูมิ 40 องสาเซลเซียส จากนั้นเติม 10% BF_3 2 มิลลิลิตร และเมทานอล 1 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เฮกเซน 1 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาทีและทิ้งให้แยกชั้น

นำสารละลายชั้นบนไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟี (Gas chromatography) กรดไขมันแต่ละชนิดรายงานในรูปของเปอร์เซ็นต์กรดไขมันต่อกรดไขมันทั้งหมด (รัตนภรณ์, 2551)

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน

จากการนำยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากดิน ดินปนเปื้อนคราบน้ำมัน และน้ำจากบ่อบำบัด ของโรงอาหารในบริเวณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจากตลาดวารินเจริญศรี จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 93 ไอโซเลต มาคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันด้วยวิธีการย้อมสี Sudan Black B พบว่ามียีสต์ทั้งหมด 60 ไอโซเลตที่ติดสีย้อมที่ไขมันภายในเซลล์ จากนั้นนำทั้ง 60 ไอโซเลตนี้มาทดสอบการสะสมไขมันเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Production medium พบว่า มีจำนวน 5 ไอโซเลต จัดเป็นยีสต์สะสมไขมันเนื่องจากสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณการสะสมไขมันที่สกัดจากยีสต์ที่คัดเลือกได้เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Production medium

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ปริมาณไขมันที่สกัดได้ (% โดยน้ำหนัก)
1	UBU-s1	16.65
2	UBU-s2/2	10.05
3	UBU-s3	8.25
4	UBU-s3/1	14.25
5	UBU-s5	8.1
6	UBU-s7	24.45
7	UBU-s9/1	9.6
8	UBU-s9/2	3.9
9	UBU-s12	20.85
10	UBU-s13	18.45
11	UBU-s16	13.95
12	UBU-$s_2$16	3.75
13	UBU-s22	7.05
14	UBU-s22/1	8.55
15	UBU-s24	7.2
16	UBU-f3	4.8
ลำดับที่	**รหัสเชื้อ**	**ปริมาณไขมันที่สกัดได้ (% โดยน้ำหนัก)**

17	UBU-f6	7.2
18	UBU-f9	4.05
19	UBU-f11	4.65
20	UBU-f12/1	5.85
21	UBU-f12/2	6
22	UBU-f13	4.65
23	UBU-f16	3.75
24	UBU-f17	8.1
25	UBU-f20	8.85
26	UBU-f24	5.25
27	UBU-f24/1	8.25
28	UBU-f26	3.3
29	UBU-f27/1	15.15
30	UBU-f27/2	5.1
31	UBU-w4	21.75
32	UBU-w4/1	8.55
33	UBU-w5	16.95
34	UBU-w6	15
35	UBU-w7	15.9
36	UBU-w8	3.6
37	UBU-w9	4.65
38	UBU-w9/1	6.45
39	UBU-w9/2	20.85
40	UBU-w11	4.95
41	UBU-w12	9.15
42	UBU-w1/12	6.15
43	UBU-w13	6
44	UBU-w14	4.8
ลำดับที่	**รหัสเชื้อ**	**ปริมาณไขมันที่สกัดได้ (% โดยน้ำหนัก)**

45	UBU-w17/2	9.9
46	UBU-w19/1	4.2
47	UBU-w19/2	5.55
48	UBU-w20	3.9
49	UBU-w23	3.3
50	UBU-gt6/1	20.25
51	UBU-gt6/2	13.05
52	UBU-gt8/1	3.3
53	UBU-gt8/2	3.45
54	UBU-gt10/2	2.4
55	UBU-gt12/1	4.5
56	UBU-gt13	4.8
57	UBU-gt15/1	7.65
58	UBU-gt15/2	3.3
59	UBU-gt18	10.8
60	UBU-gt21	3.45
60	UBU-gt21	3.45

หมายเหตุ s = (soil) ตัวอย่างจากดิน

f (fruit) =ตัวอย่างจากผลไม้เน่าเสีย

gt (grease tap) =ตัวอย่างจากดินปนเปื้อนคราบน้ำมัน

w (waste water) = ตัวอย่างจากน้ำจากบ่อบำบัด

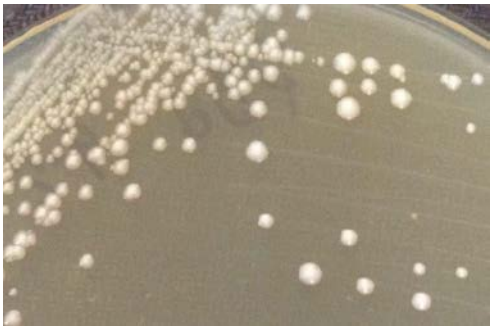
4.2 ลักษณะโคโลนีของยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้

ลักษณะโคโลนีของยีสต์สะสมไขมัน 5 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ ได้แก่ ยีสต์รหัส UBU-s7, UBU-s12, UBU-w4, UBU-w9/2 และ UBU-gt6/1 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast peptone dextrose agar (YPD) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 2

ยีสต์รหัส UBU-s7 โคโลนีขนาดใหญ่ ขอบหยัก สีขาว

ยีสต์รหัส UBU-s12 โคโลนีปานกลาง ขอบเรียบ สีขาว

ยีสต์รหัส UBU-w4 โคโลนีเล็ก ขอบเรียบ สีขาว



ยีสต์รหัส UBU-w9/2 โคโลนีปานกลาง ขอบเรียบ สีขาว

ยีสต์รหัส UBU-gt6/1 โคโลนีใหญ่ ลักษณะนูน ขอบเรียบ สีขาว

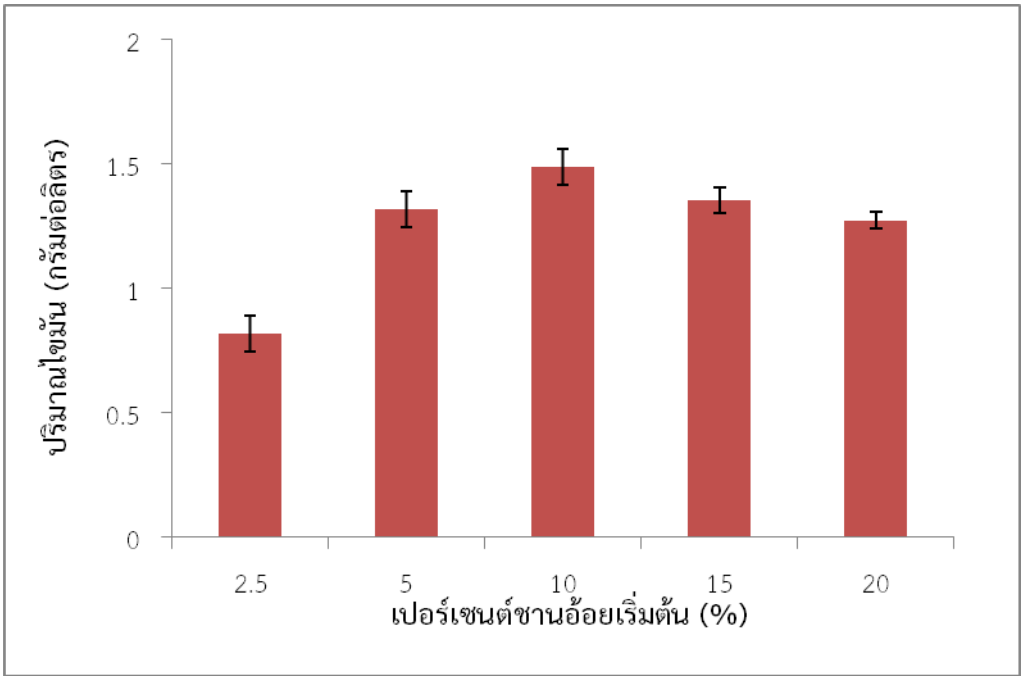
ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้ 5 ไอโซเลต บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast peptone dextrose agar (YPD) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตลิปิดของยีสต์สะสมไขมันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย

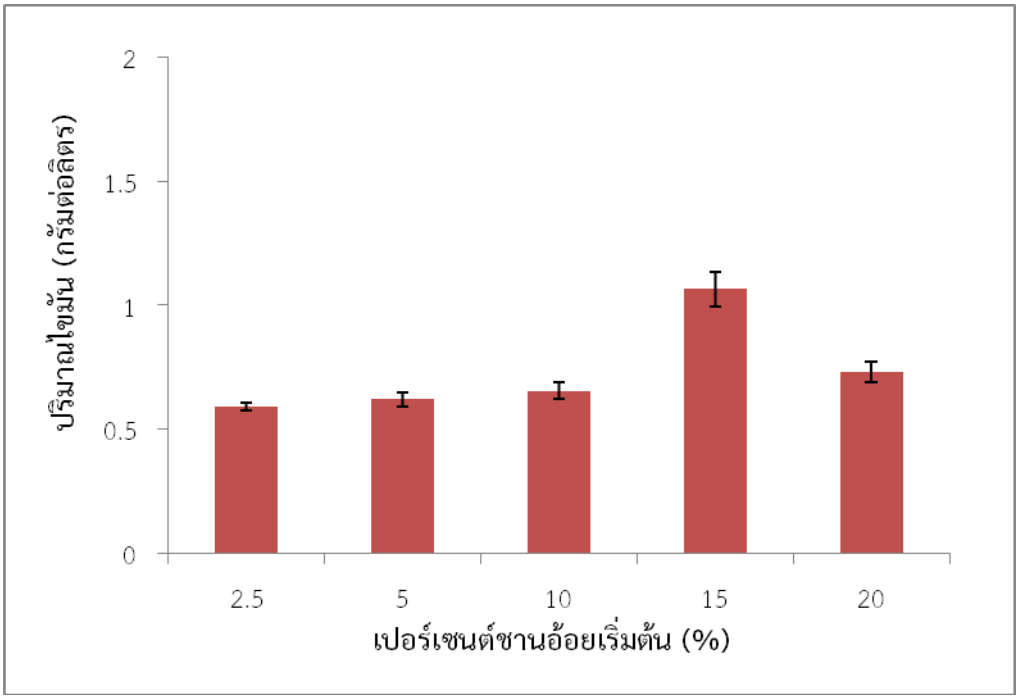
4.3.1 การศึกษาผลของปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์สะสมไขมัน

จากการทดลองการหาปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์สะสมไขมัน โดยการนำเชื้อตั้งต้น 10% (v/v) มาเลี้ยงในสารสกัดชานอ้อยในปริมาณเริ่มต้นร้อยละ 2.5, 5, 10, 15 และ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ

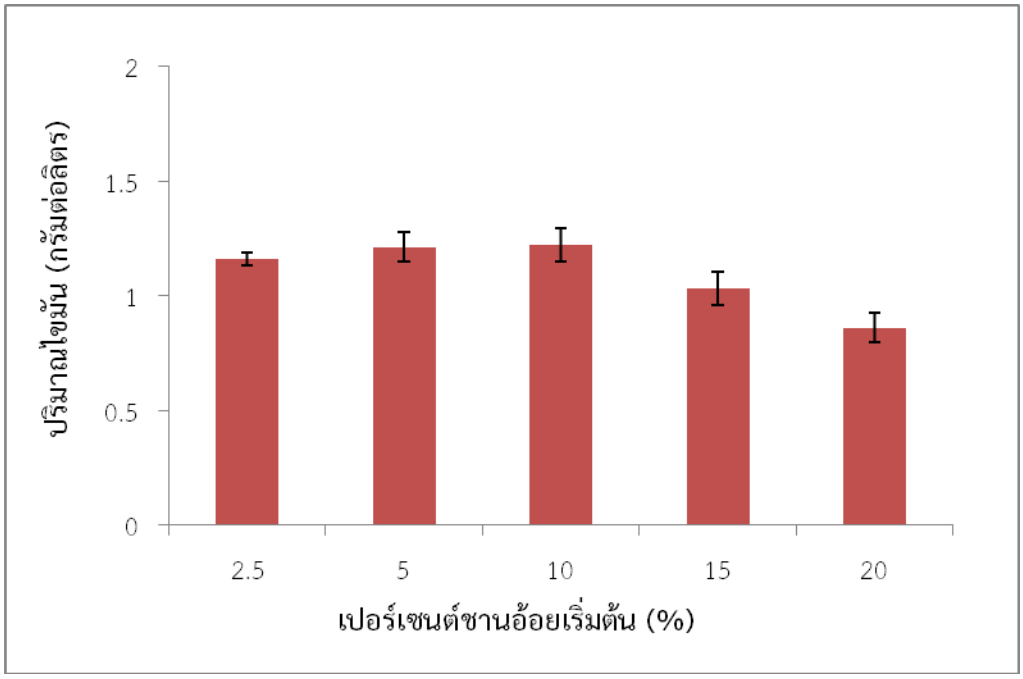
KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร และปรับค่า pH 6.0 บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ของเชื้อยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต พบว่า ยีสต์รหัส UBU-s7 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 10% เท่ากับ 1.47 กรัมต่อลิตร (28.26% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 3 ยีสต์รหัส UBU-s12 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 15% เท่ากับ 1.07 กรัมต่อลิตร (24.88% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 4 ยีสต์รหัส UBU-w4 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 2.5-10% เท่ากับ 1.25 กรัมต่อลิตร (27.17% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 5 ยีสต์รหัส UBU-w9/2 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 5-10% เท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตร (23.84% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 6 และยีสต์รหัส UBU-gt6/1 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 10-20% เท่ากับ 1.15 กรัมต่อลิตร (26.74% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 7



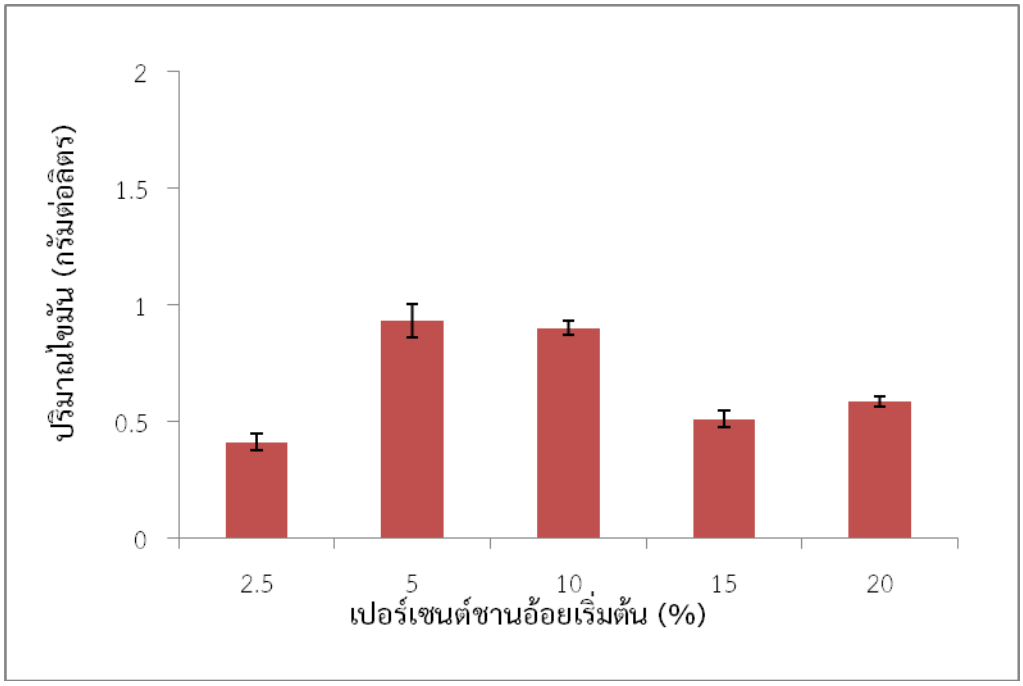
ภาพที่ 3 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s7



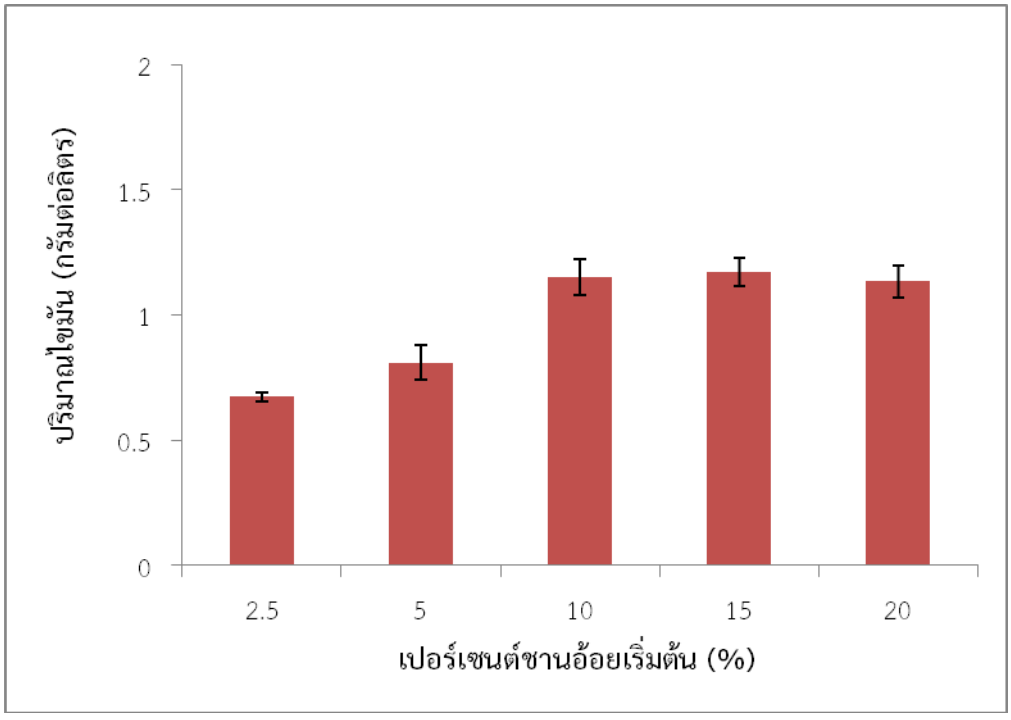
ภาพที่ 4 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s12



ภาพที่ 5 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w4



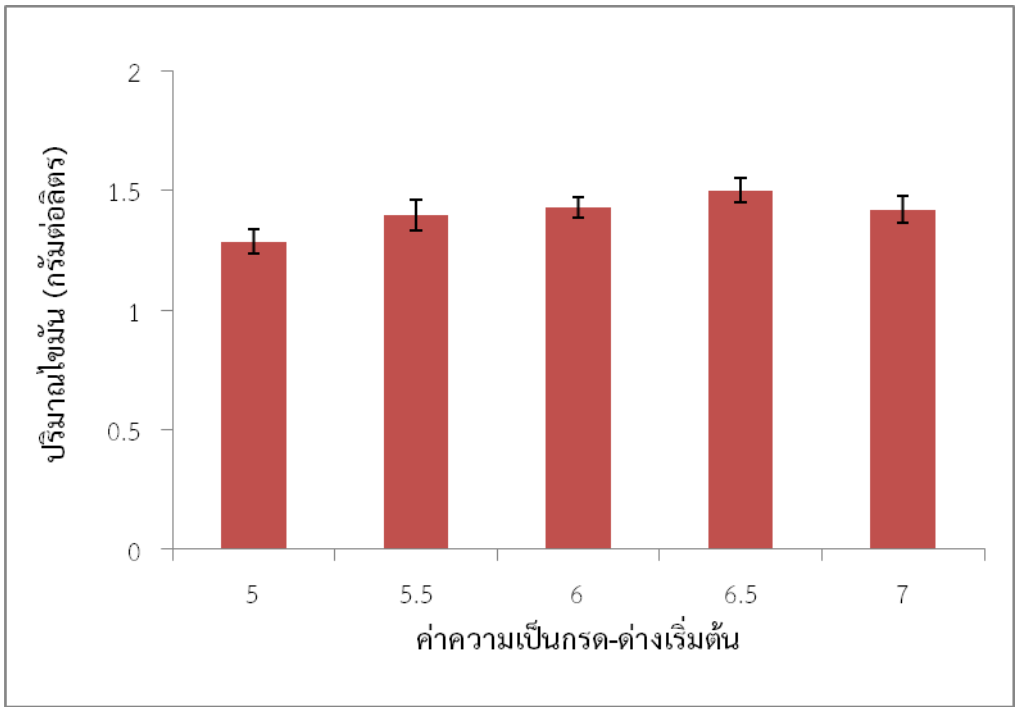
ภาพที่ 6 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w9/2



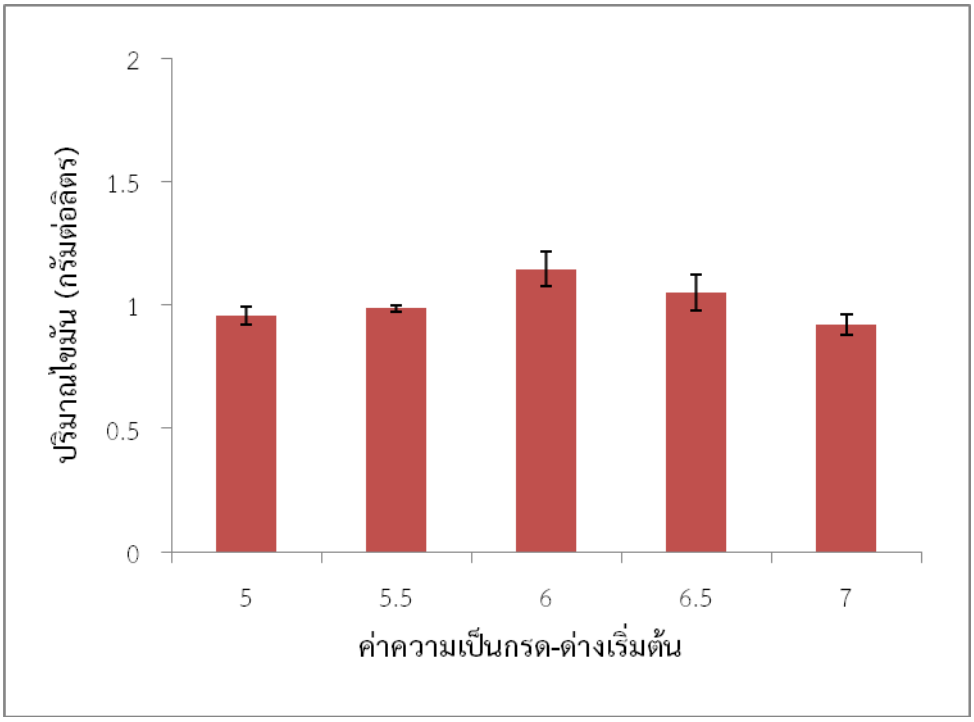
ภาพที่ 7 แสดงปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-gt6/1

4.3.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์สะสมไขมัน

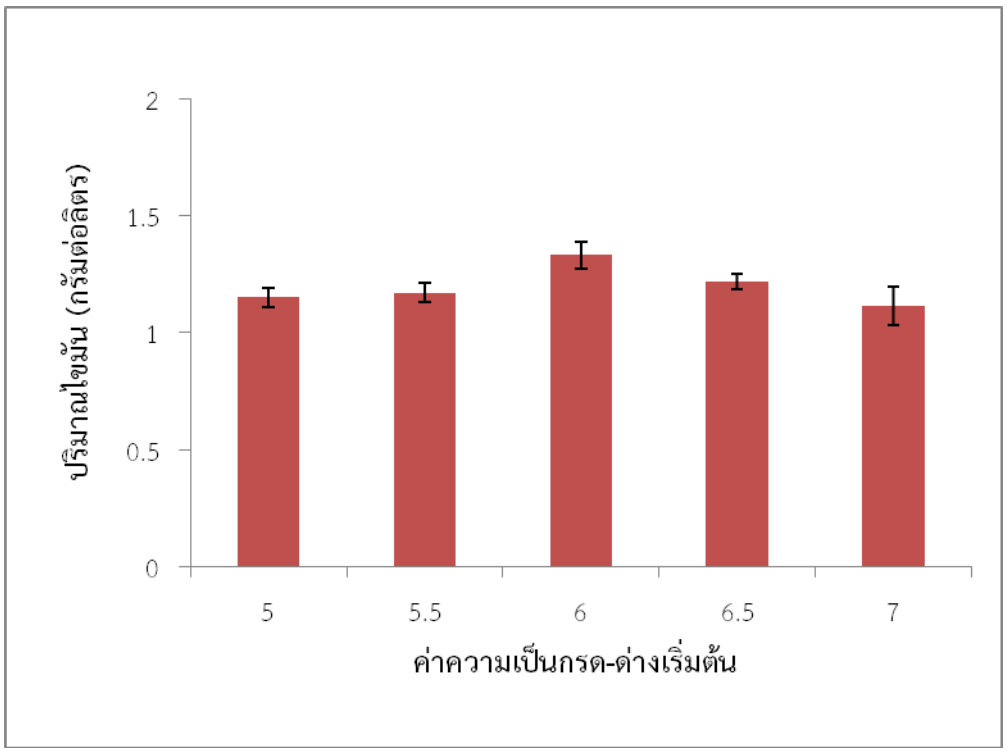
จากการนำสารสกัดจากชานอ้อยในปริมาณเริ่มต้นที่เหมะสม ที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 และปิเปตเชื้อตั้งต้น 10% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเป็นเวลา 7 วัน และศึกษาปริมาณลิปิดที่ยีสต์ผลิตได้โดยวิธี lipid extraction พบว่า ยีสต์รหัส UBU-s7 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อยที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6.5 เท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร (29.41% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 8 ยีสต์รหัส UBU-s12 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เท่ากับ 1.14 กรัมต่อลิตร (26.51% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 9 ยีสต์รหัส UBU-w4 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เท่ากับ 1.33 กรัมต่อลิตร (28.91% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 10 ยีสต์รหัส UBU-w9/2 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6.5 เท่ากับ 1.03 กรัมต่อลิตร (26.41% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 11 และยีสต์รหัส UBU-gt6/1 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เท่ากับ 1.15 กรัมต่อลิตร (26.74%โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 12



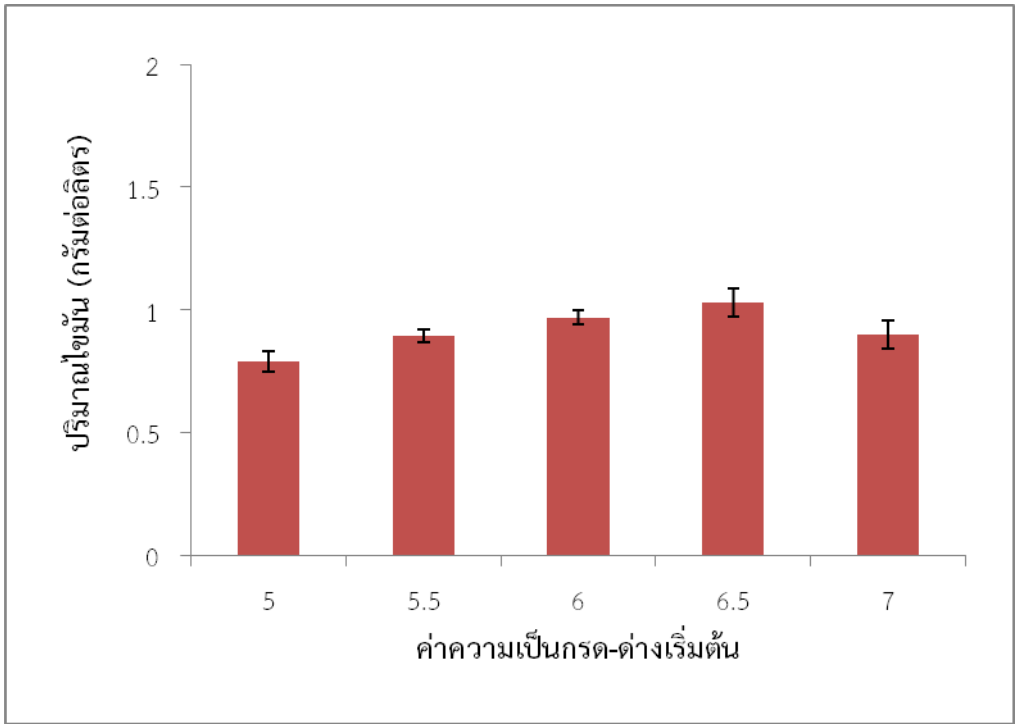
ภาพที่ 8 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s7



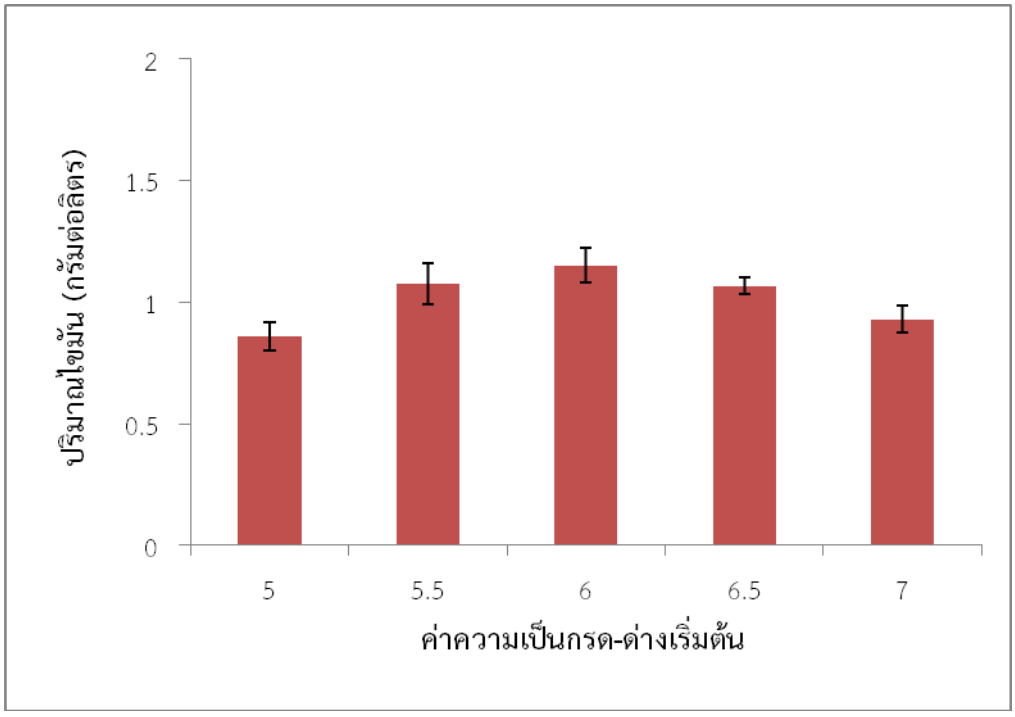
ภาพที่ 9 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s12



ภาพที่ 10 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w4



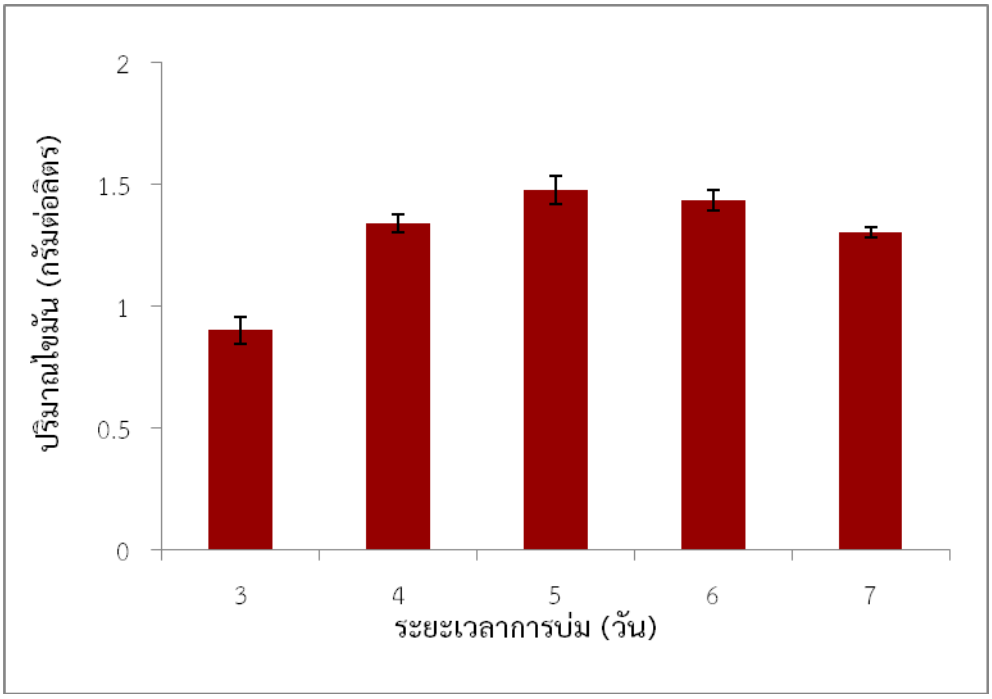
ภาพที่ 11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w9/2



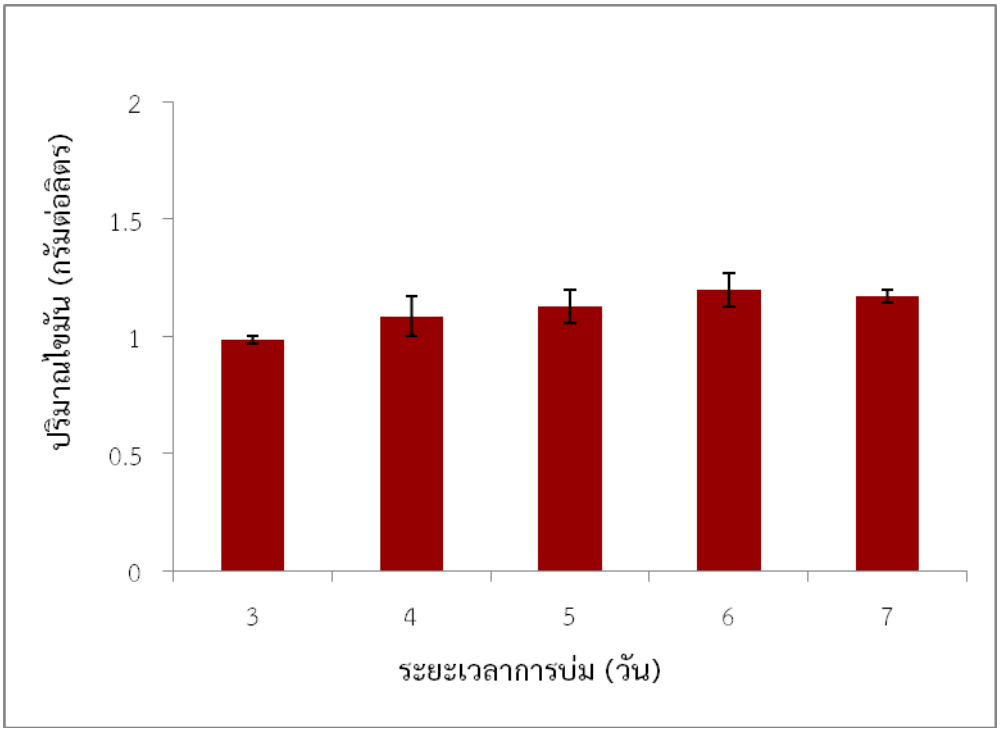
ภาพที่ 12 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-gt6/1

4.3.3 การศึกษาผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์สะสมไขมัน

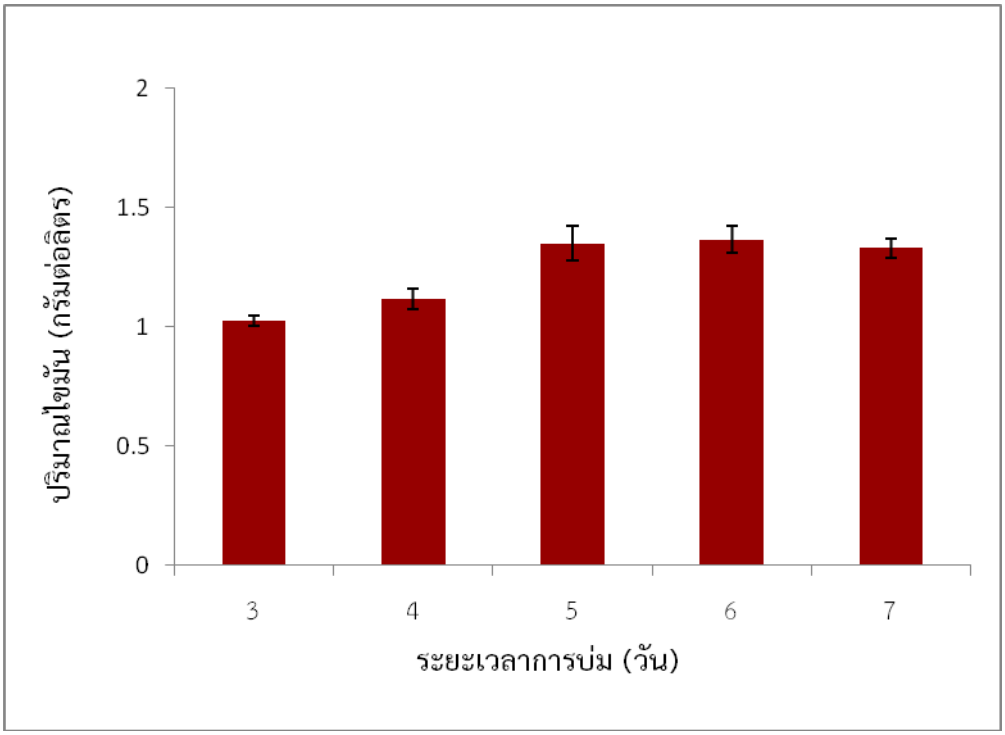
จากการทดลองนำสารสกัดจากชานอ้อยในปริมาณเริ่มต้นที่เหมาะสมของแต่ละเชื้อที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัม/ลิตร $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัม/ลิตร และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 3.2.5.2 และ 3.2.5.3 มาปิเปตเชื้อตั้งต้น 10% (v/v) และนำไปบ่มในตู้บ่มเขย่า ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงตั้งแต่วันที่ 3-7 ของการบ่ม และนำมาหาปริมาณลิปิดด้วยวิธี Lipid extraction พบว่า ยีสต์รหัส UBU-s7 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 5 เท่ากับ 1.51 กรัมต่อลิตร (29.03% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 13 ยีสต์รหัส UBU-s12 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 6 เท่ากับ 1.20 กรัมต่อลิตร (27.90% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 14 ยีสต์รหัส UBU-w4 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 5 เท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร (29.14% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 15 ยีสต์รหัส UBU-w9/2 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 7 เท่ากับ 1.05 กรัมต่อลิตร (26.92% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 16 ยีสต์รหัส UBU-gt6/1 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 5 เท่ากับ 1.18 กรัมต่อลิตร (27.44% โดยน้ำหนักแห้ง) ดังภาพที่ 17



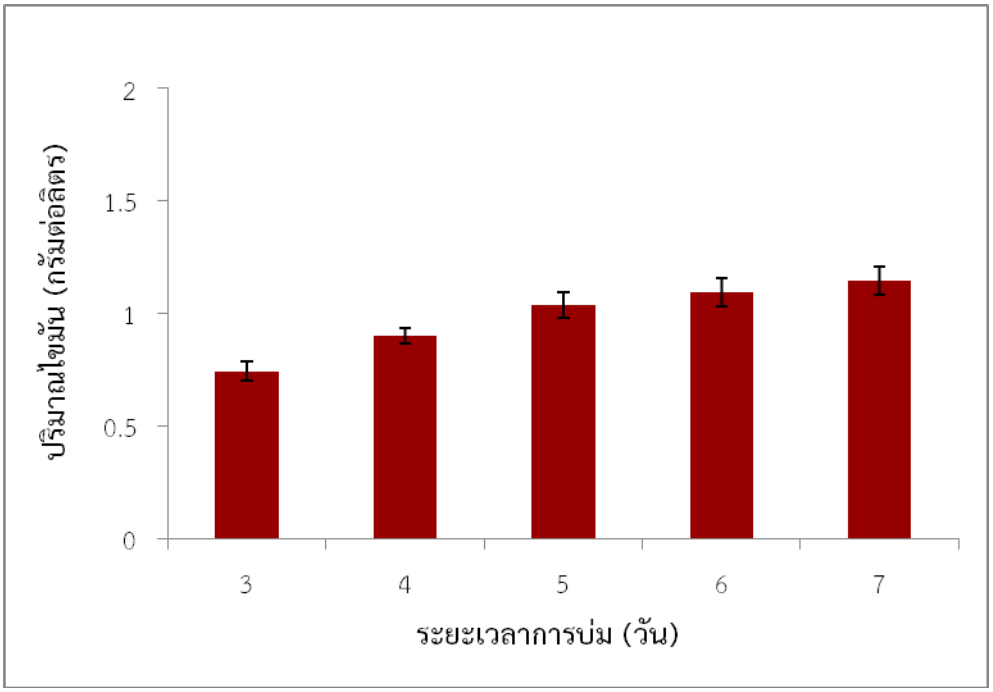
ภาพที่ 13 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s7



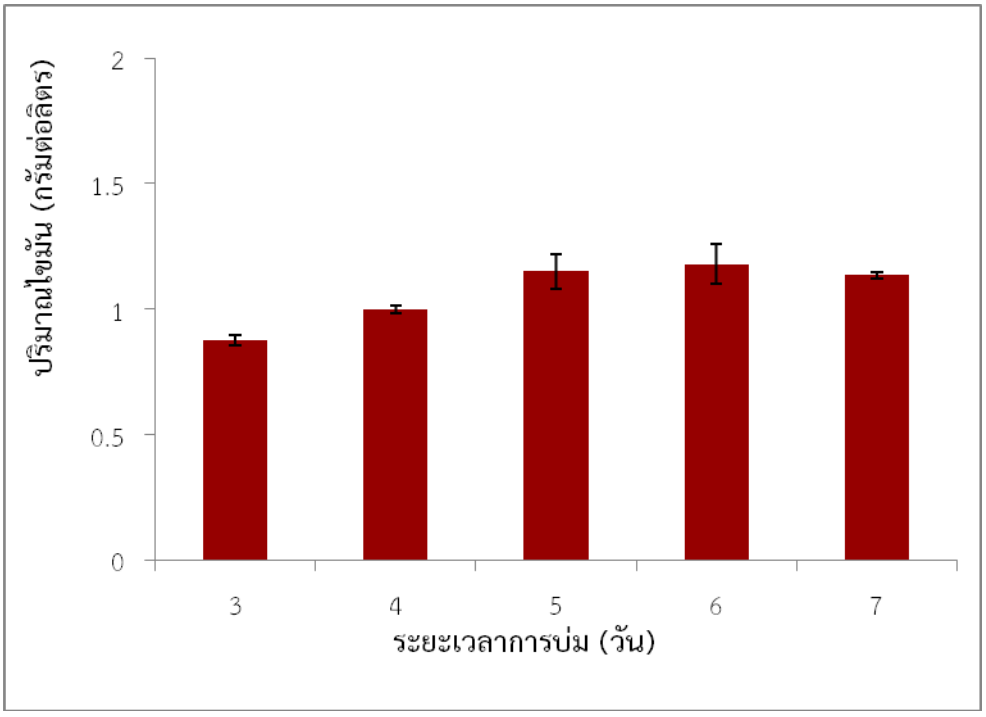
ภาพที่ 14 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-s12



ภาพที่ 15 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w4



ภาพที่ 16 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-w9/2



ภาพที่ 17 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการผลิตลิปิดของยีสต์รหัส UBU-gt6/1

4.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ UBU-s7, UBU-s12, UBU-w4, UBU-w9/2 และ UBU-gt6/1 ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่าน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ประกอบด้วย กรดปาล์มิติก (Palmitic acid; C16:0) กรดปาล์มิโตเลอิก (Palmitoleic acid, C16:1, n-9) กรดโอเลอิก (Oleic acid; C18:1) กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2, n-6) และ กรดลิโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3, n-3) โดยน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ UBU-s7, UBU-s12, UBU-w4 และ UBU-gt6/1 ประกอบด้วยกรดไขมันหลัก คือ กรดโอเลอิก ในขณะที่น้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ UBU-w9/2 ประกอบด้วยกรดปาล์มิโตเลอิก เป็นกรดไขมันหลัก ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดแยกได้

ยีสต์รหัส	ปริมาณกรดไขมัน (%เปอร์เซ็นต์กรดไขมันต่อกรดไขมันทั้งหมด)						ปริมาณไขมัน (%w/w)
	C16:0	C16:1, n-9	C18:0	C18:1, n-9	C18:2, n-6	C18:3, n-3	
UBU-s7	34.53±0.91	1.81±0.49	7.87±0.43	36.71±0.97	18.63±0.81	0.43±0.05	29.03
UBU-s12	20.26±1.04	6.51±0.64	4.84±0.39	50.09±1.21	17.53±0.82	0.75±0.04	27.90
UBU-w4	18.43±0.90	9.64±0.71	6.63±0.52	51.50±1.38	13.74±0.90	0.96±0.07	29.14
UBU-w9/2	27.08±0.82	42.34±1.08	2.94±0.28	18.94±0.79	8.19±0.52	0.50±0.02	26.92
UBU-gt6/1	18.29±0.94	8.94±0.67	5.14±0.42	50.49±1.27	16.82±0.89	0.32±0.02	27.44

จากผลการทดลอง พบว่า ยีสต์สามารถผลิตไขมันในเซลล์จาการใช้สารสกัดจากชานอ้อยที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางกรเกษตรเป็นแหล่งของอาหารได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาโดย Huang และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *Trichosporon fermentans* จากอาหารที่เตรียมจากกระบวนการย่อยสลายฟางข้าว (rice straw) ด้วยกรดซัลฟูริก พบว่าเชื้อสามารถผลิตน้ำมันได้ 1.7 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Yu และคณะ (2011) ที่ทำการศึกษาการใช้สารสกัดจากฟางข้าวสาลีด้วยกรดกรดซัลฟูริกเจือจางสำหรับการผลิตไขมัน พบว่า ยีสต์สะสมไขมัน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cryptococcus curvatus, Rhodotorula glutinis, Rhodosporidium toruloides, Lipomyces starkeyi* และ *Yarrowia lipolytica* สามารถเจริญเติบโตได้ และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้น้ำตาลที่ได้จากวัสดุประเภท lignocellulose มาผลิตไขมันได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนับว่าเป็นการนำชานอ้อยที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตน้ำมันที่มีประโยชน์ และจะเป็นการช่วยลดปริมาณวัสดุเหลือทิ้งที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีต่อการเจริญและการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้ โดยทำการศึกษาปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อย ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาต่อการผลิตไขมัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของเชื้อมากที่สุด คือ ปริมาณชานอ้อยเริ่มต้นระหว่าง 10-15% ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารอยู่ที่ 6-6.5 โดยทำการเลี้ยงประมาณ 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Paranikolaoy และคณะ (2002) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* พบว่าเซลล์มีการเจริญและผลิตไขมันสูงสุดเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และที่อุณหภูมิ 28-33 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาของ Li และคณะ (2008) ที่ทำการศึกษาการผลิตไขมันของเชื้อ *Mucor recurvus* โดยการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่ง

คาร์บอน พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 15% ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันให้ได้ปริมาณมากที่สุด

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยการเตรียมเป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยการใช้โบรอนไตรฟลูออไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในไขมันที่สกัดจากยีสต์ที่คัดแยกได้ ประกอบด้วยกรดโอเลอิกมากที่สุด รองลงมาคือกรดปาล์มิติก และกรดลิโนเลอิก ตามลำดับ จะเห็นว่ากรดไขมันที่พบนี้มีองค์ประกอบคล้ายกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันพืช ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dai และคณะ (2007) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันจากยีสต์ *R. glutinis* T216 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พบว่า น้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ประกอบด้วยกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลัก (66.96%) และรองลงมาคือ กรดปาล์มิติก (18.74%) การรายงานของรัตนภรณ์ ลีสิงห์ และงามนิจ นนทโส 2554 ที่ศึกษาองค์ประกอบของลิปิดที่สกัดได้จาก *Candida viswanathii* OYS3 ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่า เป็นกรดไขมันชนิดสายยาวโดยมีกรดปาล์มิติก กรดสเตียริก และกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลัก เช่นเดียวกัน และจากรายงานของ Chang และคณะ (2015) ที่ทำการศึกษาการสะสมไขมันของยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. SM5S05 ในอาหารที่ได้จากการไฮโดรไลเซตซังข้าวโพด และศึกษาองค์ประกอบของไขมัน พบว่ากรดไขมันที่พบส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มี 16 และ 18 อะตอมของคาร์บอน และโครงสร้างของกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตจาก *Cryptococcus* sp. จะมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของน้ำมันพืชทั่วไป จากเปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำมันจากยีสต์ที่คัดแยกได้งานวิจัยนี้กับน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ที่ได้ดำเนินการศึกษาการนำไปเป็นวัตถุดิบในการเตรียมไบโอดีเซลแล้ว จะมีองค์ประกอบคล้ายกัน ดังนั้นจากการศึกษานี้พบว่าน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลตที่คัดแยกได้นี้ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อยสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ อันจะเป็นการเพิ่มแหล่งของน้ำมันที่จะนำไปใช้ในการเตรียมการผลิตไบโอดีเซลที่จะเป็นพลังงานทดแทนได้อีกทางหนึ่ง

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกยีสต์สะสมไขมันจากยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างจำนวน 93 ไอโซเลต พบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ยีสต์รหัส UBU-s7, UBU-s12, UBU-w4, UBU-w9/2 และ UBU-gt6/1 จัดเป็นยีสต์ไขมันสูงเนื่องจากสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงกว่าร้อยละ 20 (w/w) จากนั้นนำยีสต์ 5 ไอโซเลตนี้มาศึกษาผลของปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อย ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อย และ ผลของระยะเวลาในการบ่มที่มีต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของเชื้อ พบว่า ยีสต์รหัส UBU-s7 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 10% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6.5 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน มีค่าเท่ากับ 1.51 กรัมต่อลิตร (29.03% โดยน้ำหนักแห้ง) ยีสต์รหัส UBU-s12 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 15% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน เท่ากับ 1.20 กรัมต่อลิตร (27.90% โดยน้ำหนักแห้ง) ยีสต์รหัส UBU-w4 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 2.5-10% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน เท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร (29.14% โดยน้ำหนักแห้ง) ยีสต์รหัส UBU-w9/2 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 5-10% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6.5 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน เท่ากับ 1.15 กรัมต่อลิตร (26.92% โดยน้ำหนักแห้ง) และยีสต์รหัส UBU-gt6/1 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 10-20% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน เท่ากับ 1.18 กรัมต่อลิตร (27.44% โดยน้ำหนักแห้ง)

จากการศึกษาการผลิตลิปิดของยีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้จากอาหารที่เตรียมจากสารสกัดจากชานอ้อย พบว่ายีสต์สามารถผลิตไขมันในเซลล์ได้ แสดงให้เห็นว่ายีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากกระบวนการสกัดชานอ้อยด้วยกรดมาใช้เพื่อการเจริญและการผลิตน้ำมันได้ อีกทั้งกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันจากยีสต์ที่คัดแยกได้มีองค์ประกอบหลักคล้ายกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันพืช ดังนั้นจะเห็นว่าน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์สะสมไขมันในรายงานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการนำไปใช้เตรียมไบโอดีเซลสำหรับใช้เป็นพลังงานทางเลือกได้ แต่อย่างไรก็ตามในการผลิตน้ำมันเพื่อการใช้เตรียมการผลิตไบโอดีเซลต้องการปริมาณไขมันในปริมาณสูง และใช้ระยะเวลาสั้นในการผลิต ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจะดำเนินการศึกษาการผลิตไขมันของเชื้อในสภาวะการหมักแบบกะป้อน (Fed batch) การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กองบรรณาธิการเทคนิค เครื่องกลไฟฟ้า อุตสาหกรรม. 2548. ไบโอดีเซล? พลังงานทดแทนช่วยชาติ. 22 (256): 154-163.

นิธิยา รัตนาปนนท์ 2541. วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รัตนภรณ์ ลีสิงห์. 2551. การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง. วารสารวิทยาศาสตร์ มข., 36: 129-133.

รัตนภรณ์ สีสิงห์ และ งามนิจ นนทโส. 2554. การคัดเลือกและเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงเพื่อผลิต น้ำมันจากจุลินทรีย์. KKU Research Journal, 16(2): 112-126.

ลำใย ศรีษะแก้ว 2554 บ้านสวนพอเพียง - หมู่บ้านเศรษฐกิจพอเพียงบนอินเทอร์เน็ต: แบ่งปัน สร้างสรรค์ พอเพียง ฝนมา..ไปนา..ไปสวน..Web site http://www.bansuanporpeang.com/node/15846 [สืบค้นเมื่อวันที่ 21 เมษายน 2559].

Baker, D. 1984. Fat in flour, acid analysis method. In Official method of analysis of the AOAC (William S. ed. 14th ed.) Virginia: The William Byrd Press. Inc. pp. 251-252.

Belarbi, E.H., Molina, E., Chisti, Y. 2000. A process for high yield and scale able recovery of high purity eicosapentaenoic acid ester from microalgae and fish oil. Enz Microb Technol. 26: 516–529.

Chang, Y.H., Chang, K.S., Lee, C.F., Hsu, C.L., Huang, C.W., Jang, H.D. 2015. Microbial lipid production by oleaginous yeasts *Cryptococcus* sp. in the batch culture using corncob hydrolysate as carbon source. Appl. Bioresource Technology. 72:95-103.

Chen, X.F., Huang, C., Yang, X.Y., Xiong, L., Chen, X.D., Ma, L.L. 2013. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. Bioresource Technology 143: 18-24.

Dai, C.C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y.J., Zhao, M. 2007. Biodiesel generation from oleaginous

yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. Afri J Biotech. 6:2130-2134.

Folch J, Lees M, Slone Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Appl. Journal Biology Chemical. 226: 497–509.

Gill, C.O., Hall, M.J., Ratledge, C. 1977. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (Candida 107) growing on glucose in singlestage continuous culture. Appl Environ Microb. 33: 231–239.

Hammond, E.G., Glatz, B.A. 1988. Food biotechnology-2: biotechnology applied to fat and oils. In eds. R.D. king and P.S.J. Cheetham. Elsevier Applied Science, pp: 173-200.

Huang, C, Zong, M.H., Wu, H., Liu, Q.P. 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. Bioresour Technol. 100: 4535-4538.

Kitcha, S., Cheirsilp, B. 2011. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source, Energy Procedia 9: 274–282.

Li, Y.H., Li, B., Zhao, Z.K., Bai, F.W. 2006. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. Chinese J. Biotechnol. 22: 650-656.

Li, N., Deng, Z.N., Qin, Y.L., Chen, C.L., Liang, Z.Q. 2008. Production of Polyunsaturated Fatty Acids by *Mucor recurvus* sp. with Sugarcane Molasses as the Carbon Source Food Technology and Biotechnology, 46: 73-79.

Liang, Y., Tang, T., Umagiliyage, A.L., Siddaramu, T., McCarroll, M., Ruplal Choudhary, R. 2012. Utilization of sorghum bagasse hydrolysates for producing microbial lipids Applied Energy, 91; 451–458.

Meesters P.A.E.P., Eggink, G. 1996. Isolation and characterization of a delta-9 fatty acid desaturase gene from the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* CBS 570. Appl. Yeasts. 12: 723-730.

Miller, G.L., 1959, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry, 31: 426-428.

Paranikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G. 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 308-312.

Shimizu, S., Kawashima, H., Shinmen, Y., Akimoto, K., Yamada, H., Jarfonfimongkol, S. 1989. Stimulatory effect of peanut oil on the production of dihomo-linolenic acid by filafungi. Aric. Biol. Chem. 53: 1437-1438.

Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J., Shima, J. 2013. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. Bioresour Technol. 153: 230–235.

Xue, F., Zhang, X., Lao, H., Tau, T. 2006. A new method for preparing raw material for biodiesel production. Process Biochem. 41: 1699-1702.

Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. 2008. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresour Technol. 99: 5923–5927.

Yano, Nagayama A., saito, H. and ishihara, K. 1994. Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. Lipids. 29: 527-528.

Yazawa, K., Araki, K., Okazaki, N., Watanabe, K., Ishikawa, C., Inoue, A., Numao, N., Kondo, K.J. 1988. Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. Biochem. 103: 5-7.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ และ สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. YM broth

Dextrose	5 g
Peptone	2.5 g
Yeast extract	1.5 g
Malt extract	1.5 g
Sodium propionate	1 g
Chloramphenicol	1 g

ชั่งส่วนผสม ละลายในน้ำกรองสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. YPD broth

Dextrose	2 g
Peptone	2 g
Yeast extract	1 g

ชั่งส่วนผสม ละลายในน้ำกรองสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. YPD agar

Dextrose	2 g
Peptone	2 g
Yeast extract	1 g
Agar	2 g

ชั่งส่วนผสม ละลายในน้ำกรองสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ml นำวุ้นไปต้มให้ละลายแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

1. DNS reagent

ชั่ง 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 5 กรัม ละลาย ใน 2M NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย potassium sodium tartrate (จำนวน 150 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

2. การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งน้ำตาลกลูโคสปริมาตร 0.18 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 mM จากนั้นนำไปเจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 mM ตามลำดับ

3. 0.2 N H_2SO_4

ตวง H_2SO_4 ปริมาตร 20.40 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 979.60 มิลลิลิตร

4. 0.4 M HCl

ตวง HCl ปริมาตร 39.60 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 960.40 มิลลิลิตร

5. Phosphate Buffer pH 6

ชั่ง $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 268.07 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ชั่ง $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 141.56 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารทั้งสองนี้มาปรับ pH ให้เท่ากับ 6

6. สารสกัดไขมัน

- Chloroform: Methanol (2:1, v/v)

  นำสาร Chloroform ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมกับ Methanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- 0.9% (w/v) NaCl

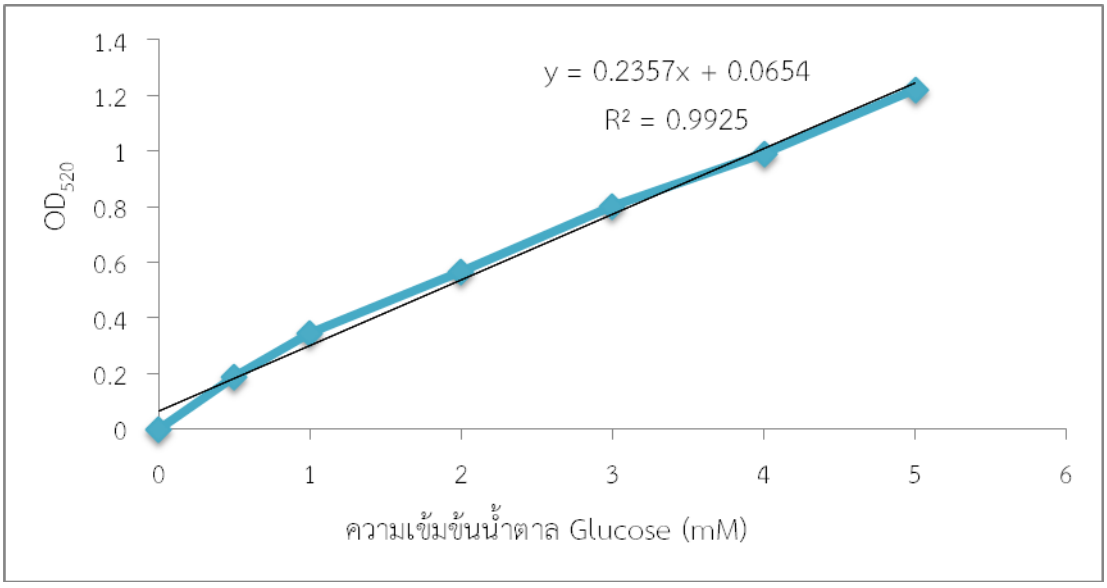
  ชั่ง NaCl จำนวน 0.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- 0.9% (w/v) NaCl : Methanol (1:1, v/v)

  ชั่ง NaCl จำนวน 0.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ Methanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
การคำนวณปริมาณน้ำตาลในสารสกัดชานอ้อย

การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลในสารสกัดชานอ้อย



กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

<u>วิธีคำนวณหาปริมาณน้ำตาลในสารสกัดชานอ้อย</u>

$$A = \varepsilon A \ell$$

A คือ ค่าการดูดกลืนแสง

ε คือ ค่า slope

ℓ คือ 1

ดังนั้น เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลได้จากสารสกัดชานอ้อยที่ทำการเจือจาง 100 เท่า มีค่า OD_{520} เท่ากับ 1.212 จะได้ปริมาณน้ำตาลดังนี้

$$A = \varepsilon A \ell$$

$$C = \frac{A}{\varepsilon l}$$

$$= \frac{1.212}{0.23 \times 1} \approx 5.3$$

$$= 5.3 \times \text{dilution factor}$$

$$= 5.3 \times 100 = 530 \text{ mM}$$

น้ำตาลกลูโคส 1 M มีน้ำหนัก 180 g

ดังนั้น 530 mM คิดเป็นน้ำหนักน้ำตาลเท่ากับ $\frac{180 \times 530}{1000}$ = 95.4 g หรือ 9.54%

ภาคผนวก ค
การคำนวณปริมาณไขมัน

1. **คำนวณหาปริมาณไขมัน**
   วิธีคำนวณ
   น้ำหนักไขมันในหลอด (g) – น้ำหนักหลอดเปล่า (g)

2. **คำนวณปริมาณไขมัน (g/l)**
   วิธีคำนวณ
   ไขมัน (g/l) = ไขมัน (g) x 1000/50

3. **คำนวณปริมาณไขมัน (% โดยน้ำหนักแห้ง)**
   วิธีคำนวณ
   ไขมัน (%) = (ไขมัน (g) / น้ำหนักเซลล์แห้ง (g)) x 100

ภาคผนวก ง
บทความสำหรับการเผยแพร่

โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์สะสมไขมันในอาหารที่เตรียมจากสารสกัดจากชานอ้อย

Production of microbial lipid by oleaginous yeast on sugarcane bagasse hydrolysate medium

จันทรพร ทองเอกแก้ว[1]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกยีสต์สะสมไขมันจากยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างจำนวน 93 ไอโซเลต พบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ยีสต์รหัส UBU-s7, UBU-s12, UBU-w4, UBU-w9/2 และ UBU-gt6/1 จัดเป็นยีสต์ไขมันสูงเนื่องจากสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นนำยีสต์ 5 ไอโซเลตนี้มาศึกษาผลของปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อย ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อย และ ผลของระยะเวลาในการบ่มที่มีต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของเชื้อ พบว่า พบว่า ยีสต์รหัส UBU-s7 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 10% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6.5 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน มีค่าเท่ากับ 1.51 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-s12 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 15% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน เท่ากับ 1.20 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-w4 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 2.5-10% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน เท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-w9/2 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 5-10% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6.5 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน เท่ากับ 1.15 กรัมต่อลิตร และยีสต์รหัส UBU-gt6/1 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากชานอ้อย 10-20% ที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน เท่ากับ 1.18 กรัมต่อลิตร ผลที่ได้นี้แสดงว่ายีสต์สะสมไขมันที่คัดแยกได้นี้มีแนวโน้มนำไปใช้ในการผลิตน้ำมันเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้

คำสำคัญ : ลิปิดจากจุลินทรีย์ ยีสต์สะสมไขมัน สารสกัดจากชานอ้อย ไบโอดีเซล

Keywords: Microbial lipid, oleaginous yeast, sugarcane bagasse hydrolysate, biodiesel

บทนำ

ไบโอดีเซลเป็นที่น่าสนใจมากในเร็วๆนี้เพราะมีประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมและทำจากทรัพยากรหมุนเวียนและยังเป็นที่ต้องการในปริมาณมากในปัจจุบัน เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือก๊ามะถันขึ้นสู่ชั้นบรรยากาศและปล่อยก๊าซมลพิษน้อยกว่าดีเซลปกติ น้ำมันพืชที่ใช้สำหรับการผลิตไบโอ

ดีเซลมีค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นจึงต้องหาปัจจัยที่จะลดค่าใช้จ่ายของการผลิตไบโอดีเซลโดยเฉพาะการลดต้นทุนของวัตถุดิบในการผลิต จุลินทรีย์สะสมไขมันจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจพบว่าจุลินทรีย์จำนวนมาก เช่น สาหร่าย ยีสต์ แบคทีเรีย และเชื้อรา ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำมันภายใต้สภาพการเพาะเลี้ยงที่ง่าย บางสายพันธุ์ของยีสต์เช่น *Rhodosporidium* sp. *Rhodotorula* sp. และ *Lipomyces* sp. สามารถสะสมไขมันภายในเซลล์สูงถึง 70% ของชีวมวลน้ำหนักแห้ง น้ำมันจากยีสต์นี้เป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพที่มีแนวโน้มในการผลิตไบโอดีเซลเนื่องจากมีองค์ประกอบที่คล้ายกันของกรดไขมันที่ได้จากน้ำมันพืชเมื่อเทียบกับน้ำมันพืชอื่นๆ จุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบหลายอย่าง เช่น วงจรชีวิตสั้น แรงงานน้อย ฤดูกาลและสภาพภูมิอากาศง่ายต่อการเจริญ (Li และคณะ 2008) นอกจากนี้ยีสต์น้ำมันยังเจริญเติบโตได้ดีบนความหลากหลายของสารตั้งต้นที่มีวัสดุที่ราคาไม่แพงเช่น สารตกค้างจากการเกษตรและอุตสาหกรรม (Zhu และคณะ 2008) น้ำมันจากจุลินทรีย์จึงอาจจะกลายเป็นหนึ่งในวัตถุดิบน้ำมันที่มีศักยภาพสำหรับการผลิตไบโอดีเซลในอนาคต

ยีสต์สะสมไขมัน (Oleaginous yeast) สามารถผลิตไขมันหรือที่เรียกว่า ลิปิด (Lipid) ได้ในปริมาณสูง ซึ่งลิปิดจะทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน และเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ลิปิดที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลซึ่งมีปริมาณความต้องการใช้น้ำมันที่สูงขึ้นของผู้บริโภค ในการที่จะผลิตลิปิดจากยีสต์ให้ได้ปริมาณที่สูงนั้นจะต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่สูง ชานอ้อยเป็นส่วนของลำต้นที่ถูกหีบเอาน้ำอ้อยออก เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ประกอบไปด้วย เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และมีน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่ ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตได้ จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนในการใช้อาหารสำเร็จรูปในการเลี้ยงเชื้อ งานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการผลิตลิปิดจากยีสต์ที่เลี้ยงในสารสกัดจากชานอ้อยเพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อกลูโคสจากอุตสาหกรรมและยังเป็นการนำเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์

วิธีการทดลอง

1.การเก็บตัวอย่างและคัดเลือกยีสต์

เก็บตัวอย่างดิน ดินปนเปื้อนคราบน้ำมัน และน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนไขมันจากบ่อบำบัดในพื้นที่เขตมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจากตลาดวารินเจริญศรี มาคัดแยกยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย yeast-malt extract (YM broth) + 0.01% chloramphenicol + 0.2% sodium propionate บ่มเขย่า 150 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมา spread plate บน YPD agar บ่ม 25°C เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมา streak plate และ restreak plate อีกครั้ง เพื่อคัดเลือกโคโลนีเดียวสำหรับใช้ในขั้นตอนถัดไป

2. การคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน

ทำการเลี้ยงยีสต์ในอาหารสูตร Production medium ซึ่งประกอบด้วย กลีเซอรอล 70 กรัมต่อลิตร, yeast extract 0.5 กรัมต่อลิตร, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน (Li และคณะ, 2006) จกานั้นนำเซลล์ยีสต์ไปทำการสกัดไขมันและวิเคราะห์หาปริมาณไขมันที่ผลิตได้

3. การสกัดและวัดปริมาณไขมันด้วยวิธี lipid extraction

นำเซลล์ยีสต์มาเติมสารผสมของ chloroform : methanol (2:1, v/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glass beads นำไปเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมสาร ประมาณ 3-4 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของสารละลายมาเติม 0.9% (w/v) NaCl ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมสาร ประมาณ 3-4 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้สารละลายแยกชั้น ดูดส่วนใสส่วนล่างมาเติมสารผสมของ 0.9% (w/v) NaCl : methanol (1:1, v/v) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร นำไปเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมสาร ประมาณ 3-4 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ดูดส่วนใสที่แยกชั้นส่วนล่างไปทำการระเหยสารสกัดในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดระเหยออกหมด นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณไขมันที่ยีสต์ผลิตได้ จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตลิปิดของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย

4.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยเชื้อที่คัดแยกได้ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลูปเต็มลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ ที่ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัม/ลิตร,Yeast extract 0.5 กรัมต่อลิตร, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร, $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และKH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 การศึกษาผลของปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยที่มีผลต่อการเจริญและผลิตลิปิดของเชื้อ

นำชานอ้อยที่ล้างสะอาดแล้วในปริมาณเริ่มต้นร้อยละ 2.5, 5, 10, 15 และ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไปสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ภายใต้หม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้เย็น และนำมากรองด้วยผ้าขาว จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี DNS โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส จะได้สารสกัดจากชานอ้อยเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อต่อไป

นำสารสกัดจากชานอ้อยที่ปริมาณเริ่มต้นต่างๆมาเติม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร, $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรดเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อตั้งต้น 10% (v/v) นำไปบ่มในตู้บ่มเขย่า ที่ความเร็วรอบ 130 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณลิปิดที่ยีสต์ผลิตได้โดยวิธี lipid extraction

4.3 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดจากชานอ้อยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของเชื้อ

นำสารสกัดจากชานอ้อยในปริมาณเริ่มต้นที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัม/ลิตร, MgS_47H_2O 0.5 กรัม/ลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัม/ลิตร มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 จากนั้นปิเปตเชื้อตั้งต้น 10% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณลิปิดที่ยีสต์ผลิตได้โดยวิธี lipid extraction

4.4 การศึกษาผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของเชื้อ

นำสารสกัดจากชานอ้อยในปริมาณเริ่มต้นที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัมต่อลิตร, $MgSO_47H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหาร

ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 4.3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อตั้งต้น 10% (V/V) นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า ที่ความเร็วรอบ 130 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณลิปิดที่ยีสต์ผลิตได้โดยวิธี lipid extraction

ผลการทดลอง

จากการนำยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างจากดิน ดินปนเปื้อนคราบน้ำมัน และน้ำจากบ่อบำบัด ของโรงอาหารในบริเวณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และตัวอย่างผลไม้เน่าเสียจากตลาดวารินเจริญศรี จำนวน 93 ไอโซเลต มาคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันด้วยวิธีการย้อมสี Sudan black B พบว่ามียีสต์ทั้งหมด 60 ไอโซเลตที่ติดสีย้อมที่ไขมันภายในเซลล์ จากนั้นนำทั้ง 60 สายพันธุ์นี้มาทดสอบการสะสมไขมันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอล พบว่า มีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ยีสต์รหัส UBU-s7, UBU-s12, UBU-w4, UBU-w9/2 และ UBU-gt6/1 จัดเป็นยีสต์ไขมันสูงเนื่องจากสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงกว่าร้อยละ 20 จากการทดลองการหาปริมาณเริ่มต้นของชานอ้อยร้อยละ 2.5, 5, 10, 15 และ20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์สะสมไขมัน ทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่า ยีสต์รหัส UBU-s7 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 10% เท่ากับ 1.47 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-s12 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 15% เท่ากับ 1.07 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัสUBU-w4 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 2.5-10% เท่ากับ 1.25 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-w9/2 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 5-10% เท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตร และยีสต์รหัส UBU-gt6/1 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อย 10-20% เท่ากับ 1.15 กรัมต่อลิตร

จากนั้นทำการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารั้งแต่ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, และ 7.0 ต่อการผลิตลิปิดของยีสต์สะสมไขมัน ทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่า ยีสต์รหัส UBU-s7 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากชานอ้อยที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6.5 เท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-s12 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เท่ากับ 1.14 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-w4 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เท่ากับ 1.33 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-w9/2 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6.5 เท่ากับ 1.03 กรัมต่อลิตร และยีสต์รหัส UBU-gt6/1 ผลิตลิปิดได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่า pH เริ่มต้นเป็น 6 เท่ากับ 1.15 กรัมต่อลิตร

เมื่อทำการศึกษาผลของระยะเวลาการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่า ยีสต์รหัส UBU-s7 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 5 เท่ากับ 1.51 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-s12 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 6 เท่ากับ 1.20 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัสUBU-w4 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 5 เท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-w9/2 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 7 เท่ากับ 1.15 กรัมต่อลิตร ยีสต์รหัส UBU-gt6/1 ผลิตไขมันได้ดีเมื่อเลี้ยงในวันที่ 5 เท่ากับ 1.18 กรัมต่อลิตร

เอกสารอ้างอิง

รัตนภรณ์ ลีสิงห์. (2551). การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง (Microbial lipid production by locally isolated oleaginous yeast). วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 36 (2):

129-138.

Chang, Y.H., Chang, K.S., Lee, C.F., Hsu, C.L., Huang, C.W., Jang, H.D. 2015. Microbial lipid production by oleaginous yeasts *Cryptococcus* sp. in the batch culture using corncob hydrolysate as carbon source. Appl. Bioresour Technol. 72: 95-103.

Chen, X.F., Huang, C., Yang, X.Y., Xiong, L., Chen, X.D., Ma, L.L. 2013. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. Bioresour Technol. 143: 18-24.

Huang, C., Zong, M.H., Wu, H., Liu, Q.P.. 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. Bioresour Technol. 100: 4535-4538.

Kitcha, S., Cheirsilp, B. 2011. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. Energy Procedia (9): 274 – 282.

Li, Y. H., Li, B., Zhao, Z. K., Bai, F.W. 2006. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. Chinese J. Biotechnol. 22: 650-656.

Li, N., Deng, Z.N., Qin, Y.L., Chen, C.L., Liang, Z.Q. 2008. Production of Polyunsaturated Fatty Acids by *Mucor recurvus* sp. with Sugarcane Molasses as the Carbon Source Food Technology and Biotechnology, 46: 73-79.

Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J., Shima, J. 2013. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. Bioresour Technol. 153: 230–235.

Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M., Chen, S. 2011. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. Bioresour Technol. 102: 6134-6140.

Zhu, LY. Zong, M.H., Wu, H. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. Bioresource Technology. 99: 7881-7885

ภาคผนวก จ

ตารางเปรียบเทียบ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

กิจกรรมที่วางแผนไว้	ระยะเวลา	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ผลที่จะได้รับ
1. เก็บตัวอย่างเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์สะสมไขมันสูง	4 เดือน	ทำการคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์สะสมไขมันสูงจากตัวอย่างดิน ดินปนเปื้อนคราบน้ำมัน น้ำจากบ่อบำบัด และตัวอย่างผลไม้เน่าเสีย	ค้นพบยีสต์จากแหล่งธรรมชาติที่สะสมไขมันในปริมาณสูง
2. การเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันสูงที่คัดเลือกได้ในอาหารที่เตรียมจากการย่อยชานอ้อยด้วยกรดและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิปิด	6 เดือน	ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้ในอาหารที่เตรียมจากการย่อยชานอ้อยด้วยกรด	การผลิตลิปิดจากยีสต์ไขมันจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย
3. ศึกษาหาองค์ประกอบและปริมาณของน้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้เพื่อใช้สำหรับการผลิตไบโอดีเซล	1 เดือน	วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้	รู้ชนิดและปริมาณของลิปิดที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมันเพื่อนำไปใช้เตรียมผลิตไบโอดีเซล
4.สรุปและการเขียนรายงาน	1 เดือน	รวบรวมวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปรายงาน	รายงานฉบับสมบูรณ์

ภาคผนวก ฉ

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวจันทรพร ทองเอกแก้ว
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Jantaporn Thongekkaewประวัติผู้วิจัย
2. หมายเลขบัตรประชาชน 3200101013xxx
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
   รองศาสตราจารย์ สังกัดภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
   โทร. 0-4543-3110-2 ext. 4495 E-mail: jantaporn_25@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2535	ปริญญาตรี	วท.บ. วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2538	ปริญญาโท	วท.ม. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2549	ปริญญาเอก	ปร.ด. ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   6.1 Isolation and identification of yeast
   6.2 Molecular genetic of yeast (Cloning and Expression the interested gene in yeast expression system)
   6.3 Enzyme technology
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

Research experiences

2002-2008 ทุนแลกเปลี่ยนนักวิจัยภายใต้โครงการระหว่าง JSPS-NRCT โดยมีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Yamaguchi University เป็นแกนนำ ภายใต้โครงการเรื่อง “Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their

Applications in Thailand and Japan" โดยไปทำวิจัยระยะสั้น ณ NRIB, Higashi-Hiroshima ประเทศญี่ปุ่น

2008 ทุนแลกเปลี่ยนนักวิจัยภายใต้โครงการระหว่าง JSPS-NRCT โดยมีมหาวิทยาลัยขอนแก่น และ Yamaguchi University เป็นแกนนำ ภายใต้โครงการเรื่อง "Capacity Building and Development of Microbial Potential and Fermentation Technology towards New Era." โดยไปทำวิจัยระยะสั้น ณ NRIB, Higashi-Hiroshima ประเทศญี่ปุ่น

2009 ทุนแลกเปลี่ยนนักวิจัยโครงการ "Strategic Scholarships for Frontier Research Network" จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปี 2551

2009-2012 ทุนแลกเปลี่ยนนักวิจัยภายใต้โครงการระหว่าง JSPS-NRCT โดยมีมหาวิทยาลัยขอนแก่น และ Yamaguchi University เป็นแกนนำ ภายใต้โครงการเรื่อง "Capacity Building and Development of Microbial Potential and Fermentation Technology towards New Era." โดยไปทำวิจัยระยะสั้น ณ NRIB, Higashi-Hiroshima ประเทศญี่ปุ่น

2014 ทุนแลกเปลี่ยนนักวิจัยภายใต้โครงการระหว่าง JSPS-NRCT โดยมีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Yamaguchi University เป็นแกนนำ ภายใต้โครงการเรื่อง "New Core to Core Program A. Advanced Research Networks Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas (World-class research hub of tropical microbial resources and their utilization)" โดยไปทำวิจัยระยะสั้น ณ NRIB, Higashi-Hiroshima ประเทศญี่ปุ่น

Publications

1. **Thongekkaew, J.** and Boonchird C. 2007. Molecular cloning and functional expression of a novel extracellular lipase from the thermotolerant yeast *Candida termophila*. FEMS Yeast Res 7: 232-243.
2. **Thongekkaew, J**., Ikeda, H., Masaki, K. and Iefuji, H. 2008. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif. 60: 140–146.

3. **Thongekkaew, J**. 2008. Role of Green tea Catechins on Lower Plasma Cholesterol. KKU Sci. J. 36(2): 91-96.
4. **Thongekkaew, J.** and Iefuji, H 2009. Thermal stability of *Cryptococcus* sp. S-2 Carboxymethyl cellulase (CSCMCase) Having a Cellulose Binding Domain from a Fungal Exoglucanase: Comparison to Recombinant CSCMCase. J. Sci. Technol. 31(4), 361-365.
5. **Thongekkaew, J.** 2009. Nutritive Value of Hed Kradang (*Lentinus polychrous* Lev.). KKU Sci. J. 37(3): 314-319.
6. **Thongekkaew, J**. 2009. Pomegranate (*Punica granatum* Linn.): Prevent or greatly retard the oxidative cell injury and aging fruit KKU Sci. J. 38(2): 182-189.
7. **Thongekkaew, J.** and Junyaphed, K. 2011. Diversity of thermotolerant yeasts in Phujong Nayoy National Park. KKU Sci. J. 39(2): 242-251.
8. **Thongekkaew, J**., Ikeda, H and Iefuji, H. 2012. Increases thermal stability and cellulose-binding capacity of *Cryptococcus* sp. S-2 lipase by fusion of cellulose binding domain derived from *Trichoderma reesei*. Biochemical and Biophysical Research Communications 420: 183-187.
9. **Thongekkaew, J**., Ikeda, H., Masaki, K and Iefuji, H. 2013. Fusion of cellulose binding domain from *Trichoderma reesei* CBHI to *Cryptococcus* sp. S-2 cellulase enhances its binding affinity and its cellulolytic activity to insoluble cellulosic substrates. Enzyme and Microbial Technology 52: 241-246.
10. **Thongekkaew, J**., Patangtasa, W and Jansri, A. 2014. Cellulase and xylanase production from *Candida easanensis* using agricultural wastes as substrate. Songklanakarin Journal of Science and Technology 36(6): 607-613.

Proceedings

1. **Thongekkaew, J**. Masaki, K and Iefuji, H. Production of recombinant carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2 (CSCMCase) and CSCMCase coupling with cellulose binding domain by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris* and purification of recombinant enzymes. The concluding Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, October 17-20, 2007, Walairak university, Thailand.
2. **Thongekkaew, J.** Iefuji, H. Functional Analysis of *Cryptococcus* sp. S-2 lipase having fungal cellulose binding domain. The 1st join seminar Asian Core Program Joint Seminar on Capacity Building and Development of Microbial Potential and Fermentation Technology towards New Era. March 19-21, 2009 at The Graduate School, Kasetsart University, Thailand
3. **Thongekkaew, J**. Masaki, K and Fujii, T. Functional characterization of CSCMCase-CBD and CSCMCase-2CBD for industrial applications and optimization of the cellulolytic and xylanolytic enzymes production from thermotolerant yeasts. The

concluding Joint Seminar on Capacity Building and Development of Microbial Potential and Fermentation Technology towards New Era. November 18-20, 2012, Shimonoseki, Japan.

4. **Thongekkaew**, J. Masaki, K and Fujii, T. Optimization of the cellulolytic and xylanolytic enzymes production from *Candida easanensis* strain JK-8. The 1st Joint Seminar New Core to Core Program A. Advanced Research Networks. August 10 – 11, 2014, Bangkok, Thailand