การผลิตไขมันจากยีสต์ที่มีไขมันสูงเพื่อใช้เป็นไบโอดีเซลยุคที่สอง

Lipid Production for Second Generation Biodiesel by the Oleaginous Yeast

มาลินี ศรีอริยนันท์[1*], จิรภา เพชรสม[2], ศศิธร คงเรือง[3]

Malinee Sriariyanun[1*], Jirapa Phetsom[2], Sasithorn Kongruang[3]

Received: 31 May 2013; Accepted: 11 August 2013

บทคัดย่อ

การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สองจากมวลชีวภาพที่ไม่ใช่อาหาร (non-food biomass) ได้รับความสนใจจากนักวิจัยและอุตสาหกรรมทั่วโลกเพื่อรองรับความต้องการการใช้พลังงาน ไบโอดีเซลคืออัลคิลเอส-เตอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Alkyl Esters (FAAEs)) ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานเอสเตอริฟิเคชั่นระหว่างแอลกอฮอล์กับไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols (TAGs)) ไตรเอซิลกลีเซอรอลพบมากในรูปของไขมันสะสมของพืชน้ำมันและไขมันสัตว์ที่เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้ไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตไบโอดีเซล บทความนี้มุ่งเน้นนำเสนอถึงความก้าวหน้าของงานวิจัยเกี่ยวกับยีสต์ที่มีไขมันปริมาณสูงเพื่อใช้ผลิตไบโอดีเซลรุ่นที่สอง และความแตกต่างเชิงเปรียบเทียบของกลไกการสร้างไขมันกับยีสต์ที่มีไขมันต่ำ และยังมีการอภิปรายถึงความรู้ที่เกี่ยวข้องกับระบบเทคโนโลยีชีวภาพ (systems biotechnology) เพื่ออธิบายกลไกทางชีวเคมีของการสร้างและสะสมไขมันเพื่อนำไปสู่การพัฒนาการเพิ่มการผลิตไขมันจากยีสต์ต่อไป

คำสำคัญ: ยีสต์ผลิตไขมัน ไบโอดีเซลรุ่นที่สอง การผลิตไขมัน ไตรเอซิลกลีเซอรอล

Abstract

Production of second-generation biofuels derived from non-food biomass is currently at the center of attention of researchers and industries worldwide as a method of supplying the requirement for sustainable energy. Biodiesel is composed of fatty acid alkyl esters (FAAEs) that are conventionally produced through the transesterification reaction of alcohol and triacylglycerols (TAGs). TAGs are mainly found as the lipid storage of living organisms, including oilseed plants and microalgaes. Therefore, a sustainable supply of TAGs is a major bottleneck for current biodiesel production because the oilseed plants are competitive with foods and feedstocks. This review focuses on the ongoing researches on oleaginous yeasts producing high contents of lipids for production of second generation biodiesel. The comparative studies of the lipid synthesis mechanism between oleaginous and non-oleaginous yeasts are described. Additionally, the knowledge of systems biotechnology and the biochemical mechanisms of lipid synthesis and accumulation are also comprehensively discussed.

Keywords: Oleaginous yeast, Second generation biodiesel, Lipid production, Triacylglycerol

[1] บัณฑิตวิทยาลัยวิศวกรรมศาสตร์นานาชาติไทย-เยอรมัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ประเทศไทย. [2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย. [3]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ประเทศไทย E-mail: macintous@gmail.com

[1] Thai-German Graduate School of Engineering, King Mongkut's University of Technology, North Bangkok, Thailand. [2]Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Thailand. [3]Department of Biotechnology, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology, North Bangkok, Thailand. [*]Corresponding author: macintous@gmail.com

** Corresponding author: E-mail: macintous@gmail.com*

บทนำ

ไบโอดีเซล คือพลังงานชีวภาพทดแทนน้ำมันดีเซล วัตถุดิบส่วนใหญ่ได้มาจากน้ำมันพืช เช่น ปาล์ม ถั่วเหลือง และไขมันสัตว์ ทำปฏิกิริยา ทรานเอสเตอริฟิเคชั่น (transesterification) ระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) กับแอลกอฮอล์ (alcohol) โดยมีเบสเช่นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) หรือปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชั่น (esterification) ระหว่างกรดไขมัน (fatty acid) กับแอลกอฮอล์ โดยมีกรด เช่น กรดซัลฟูริค (sulfuric acid) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลผลิตเป็นสารโมโนอัลคิลเอสเตอร์ (mono-alkyl-ester) (เช่น เมทิลเอสเตอร์ของกรดไขมัน, fatty acid methyl ester: FAME และเอทิลเอสเตอร์ของกรดไขมัน, fatty acid ethyl ester: FAEE) ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสามารถใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดหรือเบสที่มีราคาถูก

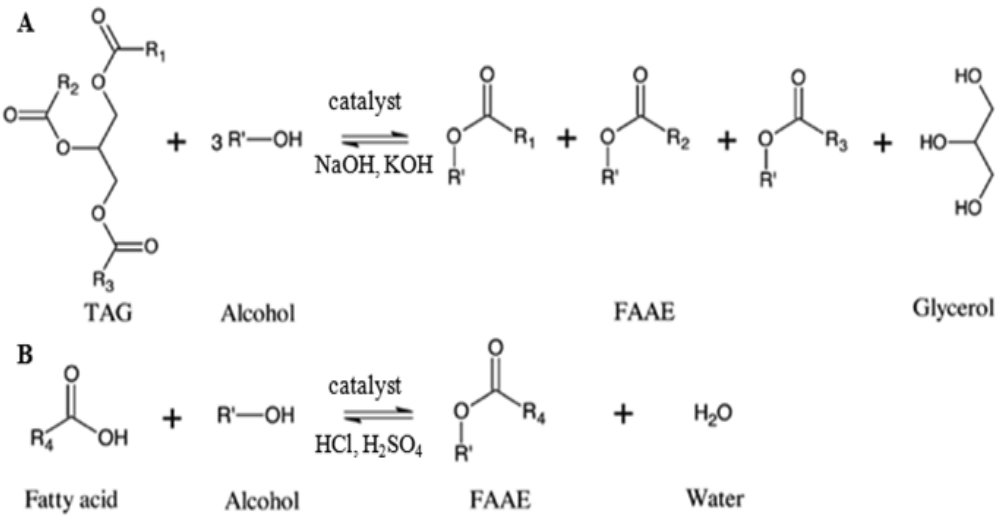

Figure 1 Biodiesel production reaction. (A) Transesterification and (B) Esterification (1)

ในปัจจุบันมีการผสมไบโอดีเซลกับน้ำมันดีเซลในสัดส่วนร้อยละ 5-10 (B5-B10) เพื่อใช้ในเครื่องยนต์ดีเซล ทั้งนี้จากแผนการพัฒนาพลังงานทดแทนของประเทศไทย (Alternative Energy Development Plan, AEDP, www.dede.go.th) ช่วงปี พ.ศ. 2555-2564 ได้ตั้งกรอบการพัฒนาพลังงานทดแทน เช่น การเพิ่มการผลิตไบโอดีเซลในปี 2564 จากเดิม 4.5 เป็น 5.97 ล้านลิตรต่อวัน เป็นผลให้เกิดเชื้อเพลิงใหม่ทดแทนดีเซลอีก 25 ล้านลิตรต่อวัน และยังเพิ่มสัดส่วนผสมในน้ำมันดีเซลถึงร้อยละ 7 (B7) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความต้องการเพิ่มการผลิตไบโอดีเซลเป็นจำนวนมากในอนาคตอันใกล้นี้

อย่างไรก็ตามการผลิตพลังงานชีวภาพจากวัตถุดิบที่เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ (First generation biofuels) เช่น น้ำมันพืช โดยเฉพาะน้ำมันปาล์มนั้นยังมีข้อจำกัด เช่น ความเสียหายต่อผลผลิตพืชซึ่งเป็นผลมาจากสภาวะอากาศโลกเปลี่ยนแปลง การขาดแคลนทรัพยากรน้ำ และปัญหาโรคติดต่อ ถึงแม้ว่าได้มีความพยายามค้นหาพืชต่างๆที่สามารถผลิตน้ำมันได้ในปริมาณสูง รวมไปถึงพืชที่ไม่สามารถบริโภคได้ เช่น สบู่ดำ (2) เพื่อจะได้ไม่มีการช่วงชิงกันกับพืชที่ใช้บริโภค ดังนั้นการวิจัยเพื่อผลิตพลังงานชีวภาพจากวัตถุดิบที่ไม่ใช่อาหาร (Second generation biofuels) จึงมีความจำเป็นเพื่อเพิ่มการผลิตพลังงานให้เพียงพอ

การพัฒนาการผลิตไขมันในยีสต์

ปัจจุบันประเทศไทยกำลังประสบปัญหาการกำจัดของเหลือทิ้งที่เกิดจากอุตสาหกรรม จึงเป็นโอกาสที่ดีของเทคโนโลยีใหม่เพื่อใช้ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเป็นวัตถุดิบหรือเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำมันและไขมัน หรือไขมันจากเซลล์เดี่ยว (single cell oils) ซึ่งไขมันที่สะสมในเซลล์สามารถนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ด้วยกระบวนการทรานเอสเตอริฟิเคชั่น และมีการผลิตกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยา ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นได้ถ้าไม่ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น แต่ก็สามารถใช้กลีเซอรอลเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ ด้วยเหตุนี้การใช้จุลินทรีย์จำพวก ยีสต์ รา และสาหร่ายจึงน่าสนใจอย่างยิ่งเพราะสามารถนำมาผลิตพลังงานจากวัตถุดิบที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมได้

ยีสต์ผลิตน้ำมันถือได้ว่าเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่ทราบกลไกทางชีวเคมีในการสร้างไขมันเป็นอย่างดีแล้ว (3, 4) ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 2 โดยแผนผังเมตาบอลิซึมนี้อ้างอิงมาจากยีสต์ผลิตน้ำมัน *Yarrowia lipolytica* ซึ่งอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีไขมันสูง และสามารถผลิตไขมันสะสมในรูปแบบของไตรเอซิลกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่โดยเก็บเอาไว้ในออร์แกเนลจำเพาะ จะเห็นได้ว่าอะเซติลโคเอ (acetyl-CoA) ที่เป็นสับสเตรตในการสร้างไขมันนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงไปได้สองรูปแบบคือกรดไขมันหรือไตรเอซิลกลีเซอไรด์ ซึ่งผลผลิตทั้งสองรูปแบบนั้นต่างก็นำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้

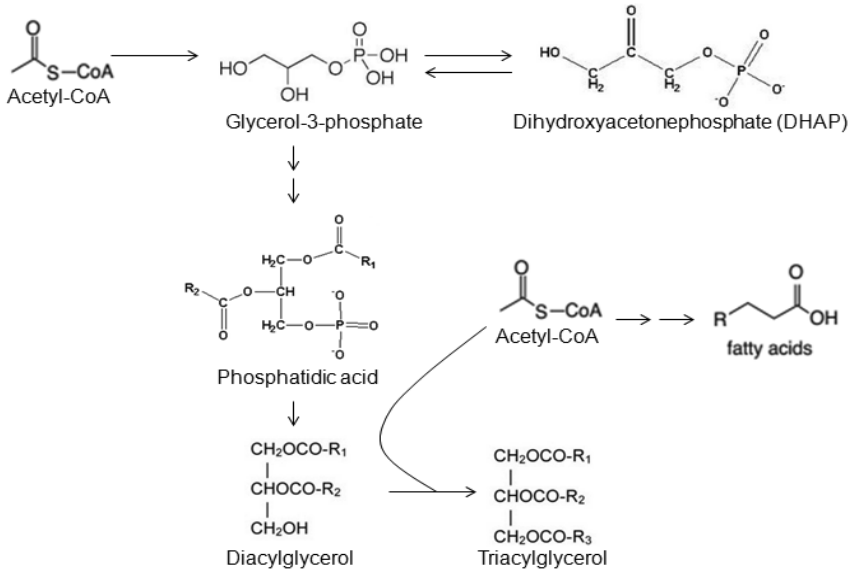

Figure 2 Lipid synthesis pathway (3, 4)

ในประเทศไทยมีตัวอย่างการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันในพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น **(5)** พบว่ายีสต์ไอโซเลท OYS3 สะสมลิพิดสูงร้อยละ 52.7 ซึ่งเจริญได้ดีในกลีเซอรอลและกากน้ำตาลที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรม และผลิตลิพิดได้ร้อยละ 37.2 และร้อยละ 39.4 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ นอกจากนี้มีรายงานว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์อื่นๆก็มีศักยภาพสูงในการผลิตไขมัน เช่น *Rhodosporidium toruloides* มีไขมันประมาณร้อยละ 55-68 (6) *Yarrowia lipolytica* มีไขมันประมาณร้อยละ 30-43 (7) และ *Rhodotorula gracilis* ที่มีไขมันประมาณร้อยละ 72 (8) เป็นต้น

การสร้างและสะสมไขมันในยีสต์

ส่วนมากการสะสมไขมันในสิ่งมีชีวิตจะอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้ว ไม่ละลายน้ำ การเก็บสะสมไขมันในรูปนี้มีข้อดีเพราะถูกออกซิไดซ์ได้น้อย มีค่าพลังงานสะสมสูง ไตรเอซิลกลีเซอรอลจะพบมากในยูคาริโอต (eukaryote) ในพืชจะมีการสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอลในเมล็ด ส่วนในสัตว์จะสะสมในรูปของเซลอะดิโปไซต์ (adipocyte) (9) โดยปกติไขมันจะมีการสะสมเมื่อเซลล์ได้รับปริมาณอาหารที่มากเกินพอ แต่เมื่อขาดแคลนอาหาร ไขมันที่สะสมไว้จะถูกเคลื่อนย้ายไปใช้เป็นพลังงาน เนื่องจากกระบวนการผลิตไขมันเป็นกระบวนการพื้นฐานของทุกสิ่งมีชีวิต แต่สิ่งมีชีวิตที่มีการเก็บสะสมไขมันมากกว่า 20% ของมวลน้ำหนักแห้งจะเรียกว่าพวกมีปริมาณไขมันสูง (oleaginous organisms) กระบวนการสะสมไขมันในเซลล์ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอลเกิดได้จากสองกระบวนการใหญ่ดังแสดงในรูปที่ 3 คือ (1) การนำเข้าของสับเสรตกลีเซอรอล (*ex novo* accumulation pathway) และ (2) การสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ (*de novo* synthesis) (10, 11) การสังเคราะห์ไขมันเป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องโดยจะเริ่มจากอะซิทิลโคเอเปลี่ยนไปเป็นกลีเซอรอลทรีฟอส เฟต (glycerol-3-phosphase) หรือไดไฮดรอกซีอะซิโทนฟอสเฟต (dihydroxy-acetonephosphaste) ซึ่งผลผลิตที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมนี้จะได้กรดไขมันอิสระและถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์ต่างๆเช่น ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ส่วนกระบวนการนำเข้ากลีเซอ รอลจากภายนอกจะต้องมีการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นกลีเซอรอลทรีฟอสเฟตก่อนเพื่อสามารถนำเข้าเซลล์ได้ จากนั้นก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไดไฮดรอกซีอะซิโทนฟอสเฟต เพื่อสร้างไตรเอซิลกลี เซอรอลต่อไป

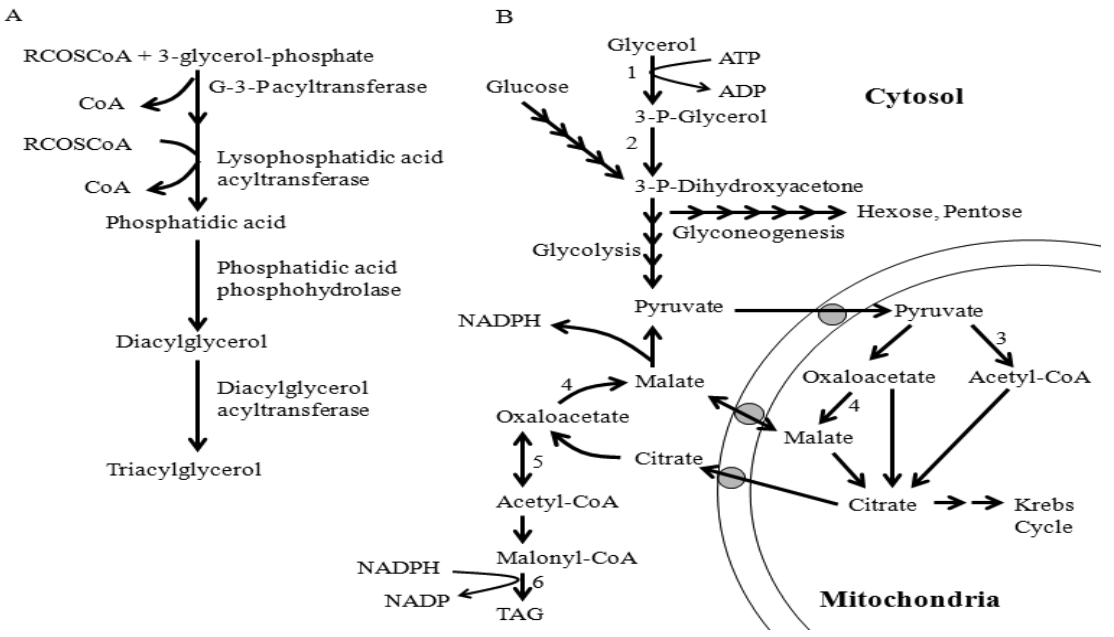

Figure 3 Triacylglycerol synthesis pathway. (A) *de novo* synthesis and (B) *ex novo* accumulation pathway (1 = glycerol kinase, 2 = glycerol-3-phosphate denydrogenase, 3 = pyruvate dehydrogenase, 4 = malate dehydrogenase, 5 = ATP-citrate lyase, 6 = fatty acid synthetase)(4).

ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมไขมันของยีสต์

จุลินทรีย์ที่มีปริมาณไขมันสูงจะสะสมไขมันเมื่อมีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินความต้องการหรือมีไนโตรเจนที่จำกัด นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่นอุณหภูมิ และ pH ก็มีผลต่อการสะสมไขมันด้วยเช่นกัน แหล่งคาร์บอนนั้นมีตั้งแต่พวกโครงสร้างง่ายๆเช่น น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส แลกโตส จนถึงที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนได้แก่ หางนม กากน้ำตาล กลีเซอรอล (12-17) หรือแม้แต่น้ำตาลไซโลส (xylose) ที่ได้จากลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) (15, 18, 19)

ชนิดของแหล่งไนโตรเจนก็มีผลต่อการสะสมไขมันเช่นกัน เช่น การใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ (เช่น ammonia sulfate) เพื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus albidus* CBS 4517 ช่วยส่งเสริมการผลิตไขมันได้มากกว่าเมื่อเทียบกับแหล่งอินทรีย์ (เช่น urea) (20) แต่ในการเพาะเลี้ยง *Rhodosporidium toruloides* CBS 14 ด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ช่วยเพิ่มปริมาณการผลิต ไขมันได้ดีกว่า จากร้อยละ 18 เป็น 51 ของน้ำหนักแห้งเป็นต้น (16)

กระบวนการสร้างและสะสมไขมันในยีสต์ขึ้นกับการสังเคราะห์ การเคลื่อนย้าย การย่อยสลาย และการสะสมไขมัน ซึ่งควบคุมด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่มีความคล้ายคลึงกันมาก (high homology) ในสิ่งมีชีวิตหลากหลาย ดังนั้นการศึกษากลไกเหล่านี้จึงทำให้สามารถเพิ่มการผลิตไขมันในพวกจุลินทรีย์ได้ ตัวอย่างความแตกต่างระหว่างพวกมีปริมาณไขมันสูงกับพวกมีปริมาณไขมันต่ำ คือเมื่อทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีไขมันต่ำในภาวะที่มีคาร์บอนเกินความต้องการและไนโตรเจนในปริมาณที่จำกัด ก็จะหยุดการแบ่งเซลล์และทำการสะสมอาหารในรูปโพลีแซคคาไรด์ ไกลโคเจน แต่จะไม่สะสมในรูปไตรเอซิลกลีเซอรอล

ยีสต์ชนิดที่มีปริมาณไขมันสูงมีกลไกการผลิตไขมันเริ่มต้นจากกรดซิตริคในกระบวนการไตรคาร์บอกซิลิกเอซิดไซเคิล (tricarboxylic acid cycle) ดังแสดงในรูปที่ 4 เป็นผลของไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ซึ่งจะต้องใช้อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphase (AMP)) โดยจะมีเอเอ็มพีดีอะมิเนส (AMP desaminase) ที่จะถูกผลิตมากในสภาวะที่เซลขาดไนโตรเจน ทำหน้าที่เปลี่ยนอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟตไปเป็นอิโนซีนไฟว์โมโนฟอสเฟต (inosine-5-monophosphate) และแอมโมเนีย ซึ่งแอมโมเนียนั้นจะทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจนของเซลล์ในภาวะขาดแคลนสารอาหารดังกล่าว

ในกรณีที่เซลล์เกิดภาวะขาดแคลนไนโตรเจน อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟตจะถูกย่อยสลายเป็นจำนวนมากเพื่อผลิตแอมโมเนียมาใช้ ทำให้การไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนสทำงานได้น้อยและมีปริมาณสะสมของไอโซซิเตรตและกรดซิตริคสูงในไมโทคอนเดรีย จากนั้นกรดซิตริคจะเคลื่อนที่ไปยังไซโตซอล

(cytosol) แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) และอะซิติลโคเอ ด้วยการทำงานของเอนไซม์เอทีพีซิเตรตไลเอส (ATP citrate lyase) นั่นหมายความว่าหากมีปริมาณอะซิติลโคเอสูงก็จะมีการสังเคราะห์กรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอลสูงตามไปด้วย ส่วนในพวกยีสต์ชนิดที่มีปริมาณไขมันต่ำ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ไม่มีการผลิตเอทีพีซิเตรตไลเอส ถึงแม้จะมีการสะสมกรดซิตริคมากก็จะไม่มีการสะสมของอะซิติลโคเอสูง

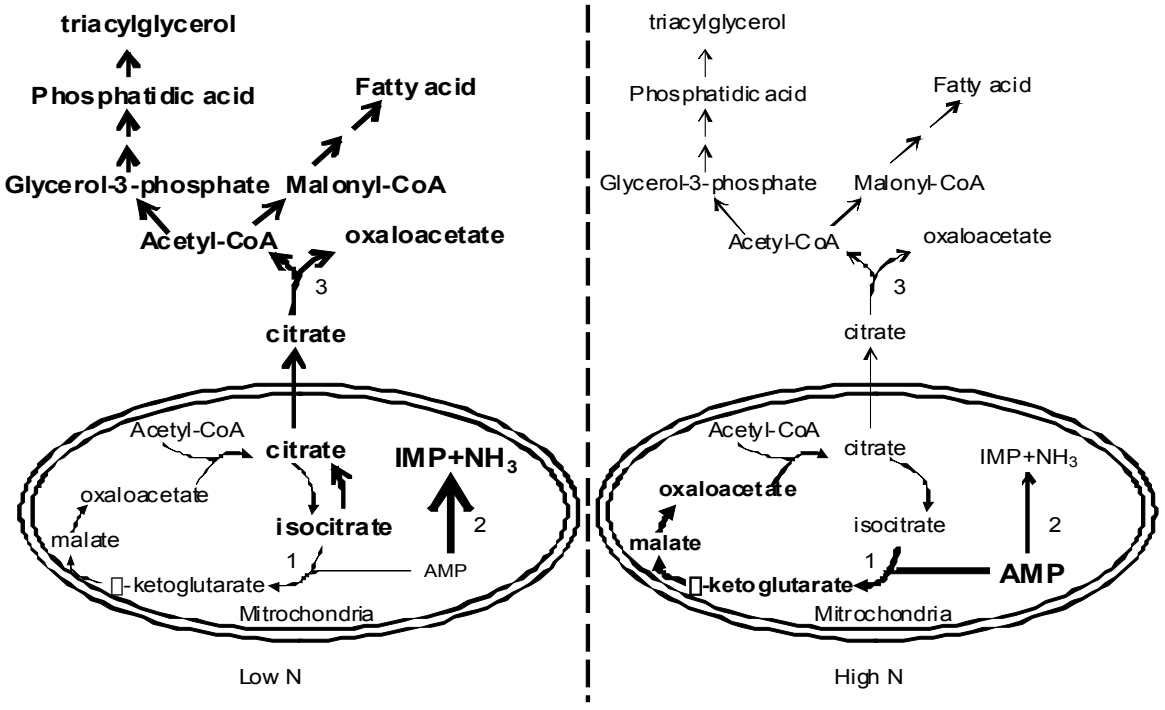

Figure 4 Oleaginous yeast cultured in low and high nitrogen media (12)

ความแตกต่างระหว่างยีสต์พวกมีปริมาณไขมันสูงและต่ำ ได้แก่ *Y.lipolytica* และ *S.cereviciae* ดังแสดงในรูปที่ 5 คือ *S.cereviciae* (1) ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสได้ดี (2) แต่ใช้กรดไขมันได้ไม่ดีเพราะกระบวนการเบต้าออกซิเดชั่นที่ใช้ผลิตอะซิติลโคเอมีประสิทธิภาพต่ำ และ (3) ไม่สามารถใช้น้ำมันในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล เพราะไม่มีเอนไซม์ไลเปส ดังนั้นถ้าหาก *S.cereviciae* อยู่ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเหลือใช้จึงผลิตเป็นเอทานอลเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ *Y.lipolytica* แม้จะสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดีเช่นเดียวกับ *S.cereviciae* เมื่ออาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเหลือใช้ *Y.lipolytica* จะผลิตสารตัวกลางของไตรคาร์บอกซิลิกไซเคิลในปริมาณสูงและนำไปผลิตเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลเก็บสะสมไว้แทน (3)

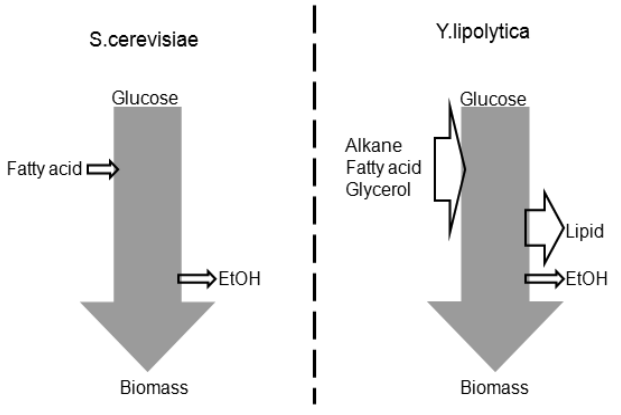

Figure 5 Comparison of metabolic pathway between *S.cereviciae* และ *Y.lipolytica* (3)

จะเห็นได้ว่ายีสต์ที่มีปริมาณไขมันสูงและชนิดที่มีปริมาณไขมันต่ำมีระบบควบคุม (regulation) กระบวนการใช้การสังเคราะห์ และการสะสมไขมันแตกต่างกัน ความแตกต่างกันนี้ขึ้นอยู่กับระดับการแสดงออกของยีน โปรตีน หรือเอนไซม์ที่ผลิตเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่าง ๆ จากการศึกษาของ Athenstaedt และคณะ 2006 (21) สังเกตจากแบบแผนโปรตีนรวม (proteome) ของ *Y.lipolytica* พบว่ามี โปรตีน 2 ชนิด คือ DGA1 และ LRO1 ที่คล้ายกัน (homology) กับเอนไซม์ไตรเอซิลกลีเซอรอลซินเทส (triacylglycerol synthase) เมื่อให้ 2 ยีนนี้แสดงออกใน *S.cereviciae* พบว่าสามารถสะสมไขมันในรูปไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ เช่นเดียวกับพวกยีสต์ชนิดที่มีปริมาณไขมันสูง (22)

แนวทางในอนาคต

งานวิจัยที่มีมาอย่างต่อเนื่องแสดงให้เห็นว่ายีสต์ที่มีไขมันสูงมีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อการผลิตพลังงานชีวภาพด้วยของเหลือทิ้งจากกระบวนการอุตสาหกรรมยังอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ หากมีการประยุกต์ใช้ความรู้จากงานวิจัยเช่นการปรับปรุงสูตรอาหารหรือสภาวะการเพาะเลี้ยงให้ยีสต์ที่ผลิตไขมันสูงมีความสามารถในการผลิตไขมันเพิ่มขึ้น หรือใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมเป็นแหล่งอาหาร หรือ การใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมทำให้ยีนที่ผลิตเอนไซม์ที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตและสะสมไขมันเพิ่มขึ้นเพื่อให้ได้ยีสต์สายพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะตามต้องการ อันจะเป็นแนวทางการเพิ่มการผลิตไขมันทำให้ราคาต้นทุนมีความเป็นไปได้ในการนำเอาไปขยายขนาดการผลิตเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Röttig A, Wenning L, Bröker D, Alexander S. Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. Appl Microbiol Biotechnol 2010;85:1713–33.
2. Winayanuwattikun P, Kaewpiboon C, Piriyakananon K, Tantong S, Thakernkarnkit W, Chulalaksananukul W, Yongvanich T. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. Biomass and Bioenergy. 2008;32:1279-86.
3. Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. Progress in Lipid Research. 2009;48:375-87.
4. Ratledge C, Wynn J. The biochemistry and biotechnology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Adv Appl Microbiol. 2002;51:1-51.
5. รัตนภรณ์ ลีสิงห์, นนทโส งามนิจ. การคัดเลือกและเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงเพื่อผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์. วารสารวิจัย มข 2011;16(2):112-16.
6. Wu S, Hu C, Jin G, Zhao X, Zhao ZK. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. Bioresour Technol 2010;101(15):6124-9.
7. Papanikolaou S, Aggelis G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. Bioresour Technol 2002;82:43-9.
8. Choi S, Ryu DY, Rhee JS. Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. Biotechnol Bioeng. 1982;14:1165-72.
9. Murphy D. Storage lipid bodies in plants and other organisms. Prog Lipid Res. 1990;29:299-324.
10. Davies R, Holdsworth JE. Synthesis of lipids in yeasts: Biochemistry, physiology and production. Adv Appl Lipid Res. 1992;1:119-59.
11. Papanikolaou S, Aggelis G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. Lipid Technol. 2009;31:83-7.
12. Papanikolaou S, Aggelis G. *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. Eur J Lipid Sci Technol. 2010;112:639-54.
13. Chatzifragkou A, Makri A, Belka A, Bellou S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. Energy. 2011;36:1097-108.
14. Fakas S, Certik M, Papanikolaou S, Aggelis G, Komaitis M, Galiotou-Panayotou M. Gamma-linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. Bioresour Technol. 2008;99(13):5986-90.
15. Fakas S, Papanikolaou S, Batsos A, Galiotou-Panayotou M, Mallouchos A, Aggelis G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single

cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. Biomass and Bioenergy. 2009;33(4):573-80.

16. Evans C, Ratledge C. A comparison of the oleaginous yeast *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. Lipids. 1983;18:623-29.
17. Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, Komaitis M, Aggelis G. Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources. Eur J Lipid Sci Technol 2007;109:1060-70.
18. Zhao X, Kong X, Hua Y, Feng B, Zhao ZB. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. Eur J Lipid Sci Technol. 2008;110:405-12.
19. Huang C, Zong MH, Wu H, Liu Q. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. Bioresour Technol. 2009;100:4535-38.
20. Hansson L, Dostalek M. Influence of cultivation conditions on lipid production by *Cryptococcus albidus*. Appl Microbiol Biotechnol. 1986;24:12-8.
21. Athenstaedt K, Jolivet P, Boulard C, Zivy M, Negroni L, Nicaud JM, et al. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. Proteomics. 2006;6:1450-59.
22. Athenstaedt K. YALI0E32769g (DGA1) and YALI0E16797g (LRO1) encode major triacylglycerol synthases of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. Biochimica et Biophysica Acta. 2011;1811(587-96).