



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมได้
จากกากสับปะรด

**Biodiesel production of the selected microorganism on pineapple
waste medium**

โดย ดร. จิตภา ทิน้อย และคณะ

พฤษภาคม 2553

สัญญาเลขที่ MRG180089

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมได้
จากกากสับปะรด

**Biodiesel production of the selected microorganism on pineapple
waste medium**

ดร. จิตภา ทิน้อย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
รศ.ดร. นวลศรี รักอริยธรรม
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความคิดเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ	สัญญาเลขที่ MRG5180089
ชื่อโครงการ	การผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมจากกาก สับปะรด
ชื่อ	นางสาวจิตาภา ทิน้อย สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
E-mail Address	rtinoi@hotmail.com
ระยะเวลาโครงการ	2 ปี (15 พฤษภาคม 2551 - 15 พฤษภาคม 2553)

บทคัดย่อ

จากการผลิตน้ำมันจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วเพื่อเตรียมเป็นไบโอดีเซล โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้จากการย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล เชื้อสามารถเจริญและผลิตน้ำมันได้มากที่สุด และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตน้ำมันของยีสต์ที่คัดเลือกแล้วในสารสกัดจากกากสับปะรด คือ ปริมาณกากสับปะรดเริ่มต้นร้อยละ 15 ความเป็นกรดต่าง 6.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 84 ชั่วโมง โดยพบน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.47 กรัมต่อลิตรของสารสกัดจากกากสับปะรดและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ร้อยละ 25.42 โดยน้ำหนักของเซลล์แห้ง และพบว่าน้ำมันที่ผลิตได้มีค่าความเป็นกรดและปริมาณกรดไขมันอิสระเท่ากับ 63.93 มิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมันและร้อยละ 22.7 โดยน้ำหนักของน้ำมันตามลำดับ และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้ด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบางพบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแก๊สพบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ กรดโอเลอิก (ร้อยละ 54.47) รองลงมาคือ กรดปาล์มิติก (ร้อยละ 18.17) และกรดลิโนเลอิก (ร้อยละ 10.77) ตามลำดับ จากนั้นได้ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้มากที่สุด พบว่าการทำให้เซลล์แตกด้วยการบดด้วยเม็ดบีดร์ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer สามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้มากที่สุดและพบปริมาณน้ำมันเท่ากับร้อยละ 47.8 โดยน้ำหนักของเซลล์แห้ง และได้เตรียมน้ำมันที่ผลิตได้เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน พบว่าการเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันผ่านกระบวนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอน พบว่าสามารถเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้มากที่สุด โดยพบปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันเท่ากับร้อยละ 97.6 โดยน้ำหนักของน้ำมันและจากการวิจัยพบว่าน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วสามารถนำมาเตรียมเพื่อผลิตเป็นไบโอดีเซลได้เนื่องจากองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายกับน้ำมันพืช ซึ่งถือว่าเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการหาแหล่งน้ำมันเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลต่อไปในอนาคตได้

คำหลัก กากสับปะรด ไบโอดีเซล *Rhodotorula glutinis* ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน การผลิตน้ำมัน

Project Code: MRG5180089

Project Title: Biodiesel production of the selected microorganism on pineapple waste medium

Investigator: Miss Jidapha Tinoi
Division of Biology, Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

E-mail Address: rtinoi@hotmail.com

Project Period: 2 years (May 15, 2008 – May 15, 2010)

Abstract:

The oil production of the selected oleaginous yeast for biodiesel preparation that cultured in pineapple waste hydrolysate medium was investigated. The suitable of pineapple waste hydrolysate for growth and oil production of selected oleaginous yeast was prepared by 0.2 N of sulfuric acid hydrolysis. The optimum condition was 15% of initial concentration of pineapple waste hydrolysate, pH 6.0 at 30°C for cultivation time of 84 h. Under the optimized condition, biomass of 5.47 g/L and oil content of 25.42% w/w were obtained. The selected yeast oil was characterized and found that the acid-value and free fatty acid content were 63.93 mgKOH/g oil and 22.7%, respectively. The selected yeast oil were characterized by TLC and the results revealed that the oil contain triacylglycerol as main component. The composition of fatty acid was analyzed by gas chromatography analysis and presented that the dominant fatty acid was oleic acid (54.47%) followed by palmitic acid (18.17%) and linoleic acid (10.77%), respectively. Then, the most effective cell disruption and oil extraction method was carried out. The results show that cell disruption method by bead-beating and extracted using organic solvent extraction according to Bligh and Dayer method presented the highest content of lipid (47.8% of cell dry weight). For preparation of biodiesel from selected yeast oil by transesterification was also investigated. The results found that the two-step transesterification presented the highest content of fatty acid methyl ester and was found to be 97.6% w/w oil. Thus, the selected yeast oil might be a valuable alternative raw material for the biodiesel production.

Keywords: pineapple waste, biodiesel, *Rhodotorula glutinis*, transesterification, oil production

สรุปย่อ (Executive summary)

เนื่องจากปัญหาทางด้านสถานการณ์ราคาน้ำมันปิโตรเลียมในตลาดโลกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้รัฐบาลและประชาชนทั่วไปให้ความสนใจกับพลังงานทดแทน โดยเฉพาะการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel) แต่การผลิตไบโอดีเซลในประเทศพบปัญหาวัตถุดิบมีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอต่อการการผลิตไบโอดีเซลและราคาของวัตถุดิบของพืชน้ำมันมีราคาสูง และทำให้การผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมันมีต้นทุนสูงตามไปด้วย ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มแนวทางในการเพิ่มปริมาณน้ำมันให้เพียงพอับความต้องการ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้ว โดยให้ความสนใจในการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ปริมาณที่มากที่สุดจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว และได้ประยุกต์ใช้กากสับปะรดที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปสับปะรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไบโอดีเซลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วด้วย ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือได้อีกทางหนึ่ง จึงเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากของเหลือใช้ที่มีปริมาณมากด้วยและเป็นการลดต้นทุนในการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ เนื่องจากอาหารสำเร็จรูปมีราคาสูง และเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป โดยได้ดำเนินการวิจัยโดยศึกษาวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด จากนั้นศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้มาเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้คัดเลือกไว้เพื่อผลิตน้ำมัน และหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตน้ำมันของเชื้อจุลินทรีย์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด เพื่อให้ได้สภาวะที่เชื้อสามารถผลิตน้ำมันได้ในปริมาณที่มากที่สุด จากนั้นวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว เพื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้น้ำมันที่จุลินทรีย์ผลิตได้ในการเตรียมเป็นไบโอดีเซล รวมถึงการหาวิธีในการสกัดแยกน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ให้มากที่สุด และศึกษาการเตรียมเป็นไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยผ่านกระบวนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน

จากการวิจัยพบว่าการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน จะได้สารสกัดจากกากสับปะรดที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยเฉพาะองค์ประกอบในส่วนของคุณภาพน้ำตาลทั้งหมด (ปริมาณคาร์บอน) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และเมื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้สารสกัดจากกากสับปะรดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตน้ำมันพบว่า สารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้สามารถนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตน้ำมันได้ โดยเฉพาะสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก พบปริมาณน้ำมันที่เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วผลิตออกมาได้มากที่สุด จากนั้นเมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลิตน้ำมันออกมาได้มากที่สุดคือ เมื่อใช้ปริมาณกากสับปะรดเริ่มต้นร้อยละ 15 ที่ค่าความเป็นกรดต่างของสารสกัด 6.0 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 84 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันได้มากที่สุด โดยพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.47 กรัมต่อลิตรของสารสกัดกากสับปะรด ปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ 1.3905 กรัมต่อลิตรของสารสกัดกากสับปะรด และคิดเป็นผลผลิตน้ำมันที่ผลิตได้เทียบกับเซลล์แห้งแล้วพบว่ามีค่า 0.2542 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้งหรือคิดเป็นผลผลิตน้ำมันร้อยละ 25.42 โดยน้ำหนักของเซลล์แห้งและพบว่าน้ำมันที่ผลิตได้มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 63.93 มิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมน้ำมัน และมีปริมาณของกรดไขมันอิสระร้อยละ 22.7 โดยน้ำหนักของน้ำมัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบในน้ำมันที่เชื้อผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส พบกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบประมาณ 15 ชนิด และกรดไขมันที่พบมากที่สุดคือ กรดโอเลอิก โดยพบร้อยละ 54.47 ของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันทั้งหมด รองลงมาคือ กรดปาล์มมิก และกรด ลิโนเลอิก โดยพบคิดเป็นร้อยละ 18.17 และร้อยละ 10.77 ของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ

นอกจากนี้จากการวิจัยได้ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์และการทำให้เซลล์แตกเพื่อสามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ให้มากที่สุด โดยศึกษาการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ การใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave extraction) การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic extraction) การใช้ความร้อนภายใต้สภาวะหม้ออัดความดันไอน้ำ (autoclaving) และการบดด้วยเม็ดบีด (bead extraction) โดยพบว่าทำให้เซลล์แตกด้วยการบดด้วยเม็ดบีดตามด้วยสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer สามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้มากที่สุด และมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 47.8 โดยน้ำหนักของเซลล์แห้ง และจากนั้นได้เตรียมไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว โดยผ่านกระบวนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 1 ขั้นตอนโดยใช้เบสเป็นตัวเร่ง ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอน และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้โดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอนที่มีกรดเป็นตัวเร่งในขั้นตอนแรกและเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเร่งด้วยเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ในขั้นตอนที่สอง จะได้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในปริมาณมากที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับร้อยละ 97.6 โดยน้ำหนักของน้ำมัน ดังนั้นจากการวิจัยพบว่าน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วสามารถนำมาเตรียมเป็นไบโอดีเซลได้ แต่การพัฒนาการนำน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์เพื่อเป็นแหล่งของไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมนั้น ยังคงต้องมีการศึกษาพัฒนาต่อไปในด้านการเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำมันจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว โดยอาจนำเทคโนโลยีทางด้านพันธุวิศวกรรมเข้ามาดัดแปลงเพื่อให้ยีสต์สามารถผลิตน้ำมันได้มากที่สุด และรวมถึงพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ ในการสกัดแยกน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ที่คัดเลือกแล้วให้มากที่สุดต่อไป

Executive summary

Biodiesel is well known as an alternative diesel fuel and is rather attractive for its biodegradable, nontoxic, clean renewable characteristic as well as the similar properties to conventional diesel fuel. The raw materials for biodiesel production mainly include biological sources such as vegetable seed oils and animal fats. However the cost of biodiesel is high due to the high cost of raw material that about 75%. Besides the use of vegetable oils as raw material would be complete with edible oils, thus leading to a rise in food prices. Using recovered animal fats, used frying oils and waste oils from restaurants as feedstock is a good strategy to reduce cost. However, these limited resources can not meet the increasing needs for clean renewable fuels. So biodiesel is still not commonly used in daily life. Recently, there has been an increasing interest in looking for biodiesel production. Among them, microbial oils, microorganisms which accumulated more than 20-25% lipids are usually referred to as oleaginous species involving bacteria, yeasts, moulds and microalgae. The oil from these microorganisms is in the form of triglycerides which has a similar component of fatty acids to that of vegetable oils. The culturing of oleaginous microorganisms is affected neither by seasons nor by climates. In addition, oleaginous microorganisms can not accumulate lipids within a short period of time but grow well on a variety of substrates, even inexpensive material, such as nutritional residues from agriculture and industry. In this research, the possibility of lipid production from pineapple waste hydrolysate by selected oleaginous yeast was explored. The selected oleaginous yeast could be accumulated a large amount of lipids when cultured in 0.2 N of sulfuric acid treated pineapple waste hydrolysate. The high biomass and lipid content were achieved after culture under optimum condition, 15% of initial concentration of pineapple waste hydrolysate, pH 6.0 at 30°C for 84 h. Biomass and lipid content were found to be 5.47 g/L and 25.42% w/w of dry cell (1.39 g/L or 0.25 g/g dry cell), respectively. The characteristics of selected yeast oil were determined and showed main component of triglycerides with high acid-value (63.93 g KOH/g oil) and free fatty acid content (22.7%). The fatty acid composition in selected yeast oil was analyzed by gas chromatography. The results presented the main fatty acid including oleic acid, palmitic acid and linoleic acid. Then, extraction methods, including organic solvent extraction, autoclaving, bead-beating, microwave and sonication were compared to identify the most effective cell disruption method. The highest lipids yield was obtained by bead-beating and extracted with solvent followed as Bligh and Dyer method and showed 47.8% w/w. The biodiesel or fatty acid methyl ester was prepared from the selected yeast oil by transesterification. One-step transesterification, two-step transesterification and lipase transesterification were carried out. The highest fatty acid methyl ester content was obtained by two-step transesterification. The first step was conducted with 70% w/w methanol-to-oil ratio in presence of 1% H₂SO₄ as an acid catalyst at 60°C in 60 min. The second step was transesterified using 30% w/w of methanol-to-oil ratio and 2% w/w NaOH to oil as alkaline catalyst to produce biodiesel at 60°C for 1 h. The final yield for fatty acid methyl ester was achieved 97.5%. Thus, the selected oleaginous yeast could be used for producing cheap microbial oil from agro-industrial residues for biodiesel production and based on these research, microbial oils from the selected yeast are a potential alternative oil resource for biodiesel production.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
สรุปย่อ	ค
Executive summary	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ลิพิด (Lipid)	4
2.2 ยีสต์ผลิตไขมันสูง หรือยีสต์ โอเลจินัส (olegenous yeasts)	11
2.3 ไบโอดีเซล	17
2.4 สับปะรด	20
2.5 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	30
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	30
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	30
3.3 สารเคมี	30
3.4 อุปกรณ์	30
3.5 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากสับปะรด	31
3.6 การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด	31
3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตน้ำมันของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด	32
3.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	33
3.9 การหาเทคนิคและวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ที่คัดเลือกแล้วให้มากที่สุด	34
3.10 การเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	35
3.11 การผลิตน้ำมันจากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วในถังหมักขนาด 5 ลิตร	37
บทที่ 4 ผลงานวิจัย	38
4.1 การเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตไขมัน	38
4.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	38
4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อในสารสกัดจากกากสับปะรด	40
4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	44

สารบัญ (ต่อ)

4.5 ผลการเปรียบเทียบเทคนิคและวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ ผลิตน้ำมันปริมาณสูงที่คัดเลือกแล้ว	48
4.6 การเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ผลิตน้ำมันปริมาณสูง ที่คัดเลือกแล้วโดยผ่านการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	49
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	57
5.1 การเตรียมสารสกัดจากกากสับประรดเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ	57
5.2 การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากกากสับประรดมาใช้เป็น อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วเพื่อผลิตน้ำมัน	58
5.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ ที่คัดเลือกแล้วเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับประรด	59
5.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	60
5.5 การสกัดน้ำมันออกจากเซลล์และการทำให้เซลล์แตกเพื่อสกัดน้ำมันจาก เซลล์ยีสต์ผลิตน้ำมันในปริมาณสูงที่คัดเลือกแล้ว	61
5.6 การเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ผลิตน้ำมันปริมาณสูง ที่คัดเลือกแล้วโดยผ่านการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	62
ข้อเสนอแนะ	65
เอกสารอ้างอิง	66

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ไขมันสูงซึ่งสามารถผลิตไขมันได้ร้อยละ 40-80 โดยน้ำหนักแห้ง	10
2.2 ยีสต์ผลิตน้ำมันสูง	12
2.3 องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จาก โอลิจินัสยีสต์ที่เลือกมา	13
2.4 กรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูง	13
2.5 เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับไขมันจากพืชไขมัน	14
2.6 ASTM standard	20
2.7 ส่วนประกอบทางเคมีแยกวิเคราะห์ตามส่วนต่างๆ ของสับปะรด (ร้อยละของวัตถุแห้ง)	21
4.1 ค่าความเป็นกรดและปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	44
4.2 แสดงเวลารีเทนชัน และปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ ในน้ำมันที่สกัดจากยีสต์	47

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของกรดไขมัน	5
2.2 โครงสร้างของ phospholipids	6
2.3 โครงสร้างของสเตียรอยด์ที่เป็นเพอร์ไฮโดรไฮโคลเพนทาโนฟีแนนทริน	6
2.4 โครงสร้าง เออโกสเตอรอล	13
2.5 <i>Rhodotorula glutinis</i>	15
2.6 ลักษณะของยีสต์ <i>Y. lipolytica</i>	15
2.7 แสดงผลพลอยได้และเศษเหลือจากโรงงานทำสบประดกระป๋อง	22
4.1 แสดงการเจริญของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับประดที่เตรียมได้	39
4.2 แสดงปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เป็น สารสกัดจากกากสับประด	40
4.3 การเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับประดเมื่อใช้ปริมาณ กากสับประดเริ่มต้นต่างกัน	41
4.4 ผลของค่าความเป็นกรดต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันจากเชื้อยีสต์ในสารสกัด จากกากสับประด	42
4.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันจากเชื้อยีสต์ในสารสกัดจาก กากสับประด	43
4.6 ผลของเวลาต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับประด	44
4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์เทียบกับน้ำมันปาล์ม	45
4.8 แสดงโครมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน ที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับประด โดยประกอบด้วยเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันดังนี้ C14:0 (myristic acid) C16:0 (palmitic acid) C18:0 (stearic acid) C18:1 (oleic acid) C18:2 (linoleic acid) C18:3 (linolenic acid) C20:0 (arachidic acid) C22:0 (behenic acid)	47
4.9 แสดงการเปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำมันจากเซลล์ยีสต์ผลิตน้ำมันในปริมาณสูง ที่คัดเลือกแล้ว	48
4.10 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน	49
4.11 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่ผลิตได้ในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์- เอสเทอร์ฟิเคชัน	50
4.12 ผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของ น้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	51
4.13 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของ น้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	52
4.14 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอส- เทอร์ฟิเคชันของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	53

สารบัญรูป (ต่อ)

4.15	ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเคชัน ของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว	54
4.16	ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเคชัน ที่เร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส	55
4.17	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์- เอสเทอร์ิเคชัน	55
4.18	ผลของปริมาณน้ำที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์- เอสเทอร์ิเคชัน	56

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันทั่วโลกประสบปัญหาทางด้านสถานการณ์ราคาน้ำมันปิโตรเลียมในตลาดโลกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้รัฐบาลและประชาชนทั่วไปให้ความสนใจกับพลังงานทดแทน โดยเฉพาะการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel) พบว่าไบโอดีเซลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่ผลิตจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน เช่น น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันพืชและสัตว์ที่ใช้แล้วหรือผลิตได้จากสาหร่าย ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงดีเซลทางเลือก นอกเหนือจากดีเซลที่ผลิตจากปิโตรเลียมโดยมีคุณสมบัติการเผาไหม้เหมือนกับดีเซลจากปิโตรเลียมมาก และสามารถใช้แทนกันได้ คุณสมบัติสำคัญของไบโอดีเซลคือ สามารถย่อยสลายได้เอง ตามกระบวนการทางชีวภาพในธรรมชาติ (biodegradable) และไม่เป็นพิษ (non-toxic) ดังนั้นรัฐบาลจึงมีนโยบายให้มีการส่งเสริมการผลิตและใช้ไบโอดีเซลเพื่อทดแทนพลังงานน้ำมันดีเซล

จุดมุ่งหมายในยุทธศาสตร์การพัฒนาและส่งเสริมไบโอดีเซล เมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ.2548 โดยตั้งเป้าหมายว่าในปี พ.ศ.2555 สามารถผลิตไบโอดีเซลได้ถึง 8.5 ล้านลิตรต่อวัน โดยให้ความสนใจในการเตรียมไบโอดีเซลแบบลูกผสมหรือผสมบางส่วนเช่น ใช้ไบโอดีเซล 10% ผสมกับน้ำมันดีเซล และปัจจุบันประเทศไทยได้ให้ความสนใจในการผลิตไบโอดีเซลจากเมล็ดสบู่ดำมากขึ้นด้วยเช่นกัน เนื่องจากเมล็ดสบู่ดำเมื่อทำการสกัดแล้ว พบว่าสามารถนำไปใช้ได้กับเครื่องยนต์ได้ทันที โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแปรรูป และพบว่าไม่มีเขม่าติดเครื่องยนต์ด้วย แต่สัดส่วนในการให้น้ำมันประมาณร้อยละ 25-30 เท่านั้น

จากรายงานของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เกี่ยวกับปัญหาและความต้องการในการผลิตและใช้ไบโอดีเซลในประเทศไทย โดยพบว่าปริมาณวัตถุดิบ เช่น พืชน้ำมันต่าง ๆ มีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอต่อการตอบสนองตามยุทธศาสตร์ของชาติในการผลิตไบโอดีเซลได้ ทั้งนี้เนื่องจากพืชบางชนิดสามารถเพาะปลูกได้ยาก ไม่สามารถเพาะปลูกได้ทุกพื้นที่ในประเทศไทย ทำให้จำกัดอยู่ในบางพื้นที่เท่านั้น ทำให้ผลผลิตที่ได้ในแต่ละปีไม่เพียงพอต่อความต้องการ นอกจากนี้ในการเพาะปลูกพืชบางชนิดจะให้ผลผลิตตามฤดูกาล และพบว่าดินฟ้าอากาศยังเป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะปลูกพืชด้วย ซึ่งส่งผลทำให้ราคาของวัตถุดิบของพืชน้ำมันมีราคาสูง และทำให้การผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมันมีต้นทุนสูงตามไปด้วย รวมถึงสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการแปรรูปน้ำมันพืชยังมีราคาสูงด้วย ปัจจุบันราคาของไบโอดีเซลจะสูงกว่าน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม ทำให้ยังไม่สามารถที่แข่งขันราคากับน้ำมันดีเซลได้อย่างเต็มที่ และนอกจากนี้สายพันธุ์ของพืชน้ำมันในประเทศไทย พบว่ายังเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตน้ำมันได้ในปริมาณน้อย ดังนั้นนักวิจัยได้พยายามศึกษาการปรับปรุงพันธุ์พืชน้ำมันให้การผลิตน้ำมันเพิ่มมากขึ้น และได้พยายามหาแหล่งพืชน้ำมันชนิดใหม่ เพื่อเป็นแหล่งใหม่ในการผลิตน้ำมันสำหรับกระบวนการผลิตไบโอดีเซลของไทย

จากข้อจำกัดในการผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมัน นั่นคือวัตถุดิบที่เป็นพืชน้ำมันสำหรับการผลิตไบโอดีเซลที่มีราคาสูง และปริมาณของวัตถุดิบไม่เพียงพอต่อการผลิต ทำให้ปริมาณการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยได้ในปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มปริมาณน้ำมันให้เพียงพอกับความต้องการ และจากการรวบรวมข้อมูลพบว่า สามารถพัฒนาน้ำมันและไขมันที่ได้จากการสังเคราะห์จากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันได้ (microbial oil) ซึ่งอาจเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการแก้ปัญหาในการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยได้ เนื่องจากประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็วกว่าพืชน้ำมัน เพราะจุลินทรีย์สามารถผลิตสารได้ตลอดเวลาเมื่อทำการปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตอยู่เสมอ รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสารต่าง ๆ พบว่าจะใช้เวลาที่สั้นกว่าและที่สำคัญสำหรับการผลิตสารจากจุลินทรีย์คือ สามารถทำการขยายปริมาณการผลิตให้มาก

ขึ้นได้ตามที่ต้องการ นอกจากนี้พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตสารตามที่ต้องการเพียงแค่ปรับสภาวะหรือบังคับให้การสังเคราะห์สารของจุลินทรีย์ไปในทิศทางที่ต้องการได้ ซึ่งจากการศึกษาและรวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้จากสาหร่าย และจากการรายงานของ Chisti (2007) พบว่าสาหร่ายที่มีขนาดเล็กหรือจุลสาหร่าย (microalgae) หรือ microalgal oil สามารถผลิตน้ำมันที่เป็นวัตถุดิบสำหรับกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้ โดยจุลสาหร่ายมีความสามารถในการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) จากบรรยากาศ เปลี่ยนไปเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายค่อนข้างต่ำ จุดประสงค์ของการผลิตน้ำมันเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายนี้เพื่อแข่งขันกับราคาไบโอดีเซลจากปิโตรเลียม พบว่าสาหร่ายที่สามารถผลิตน้ำมันเพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลได้แก่ *Botryococcus braunii* (25-75% ต่อน้ำหนักแห้ง) *Chlorella* sp. (28-32% ต่อน้ำหนักแห้ง) *Cryptocodinium cohnii* (20% ต่อน้ำหนักแห้ง), *Dunaliella prinolecta* (23%), *Nannochloropsis* sp. (31-68% ต่อน้ำหนักแห้ง), *Neochloris oleoabundans* (35-54% ต่อน้ำหนักแห้ง), *Nitzschia* sp. (45-47% ต่อน้ำหนักแห้ง), *Schizochytrium* sp. (50-77% ต่อน้ำหนักแห้ง) (Chisti, 2007; Roessler และคณะ, 1994; Sawasyama และคณะ, 1995; Dunahay และคณะ, 1996; Sheehan และคณะ, 1998; Bannerjee และคณะ, 2002; Gavrilescu และ Chisti, 2005) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วย เช่น จากเชื้อราหรือยีสต์ โดยเฉพาะในกลุ่มที่เป็น oleaginous microorganism ได้แก่ เชื้อราในตระกูล Zygomycetes ซึ่งเป็น oleaginous fungi (Certik และ Shimizu, 1999) และเชื้อราในกลุ่ม Mucurales ได้แก่ *Mucor circinelloides* หรือ *M. javanicus* (Ratledge, 1992) *Mortierella isabellina* (Nakabara และคณะ, 1992) *Cunninghamella echinulata* (Chen และ Lui, 1997) *Mortierella apina* (Eroshin และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อยีสต์บางชนิดสามารถผลิตน้ำมันได้ เช่น เชื้อยีสต์ในตระกูล Rhodotorula เช่น *R. acheniorum*, *R. aurantiaca*, *R. bacarum*, *R. fujisanensis* (Perrier และคณะ, 1995) และ *Rhodotorula glutinis*, *Candida utilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* 2 สายพันธุ์ (Xue และคณะ, 2007) โดยพบว่าเชื้อ *R. glutinis* สามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุดคือประมาณ 10% และพบว่าไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้เมื่อผ่านกระบวนการ transesterification พบว่าจะได้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl ester) คิดเป็น 92% ของไขมันทั้งหมด โดยเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ผลิตได้ถือว่าเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และจากการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อ *R. glutinis* นี้ พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตคือ ปริมาณของคาร์บอนและแหล่งของคาร์บอน ดังนั้นในการพัฒนาเพื่อให้เชื้อสามารถผลิตไบโอดีเซลให้มากขึ้น จึงต้องเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลด้วย

สำหรับในการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์พบว่าได้มีการประยุกต์ใช้ของเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปอาหารหรือจากโรงงานอุตสาหกรรมมาเตรียมเพื่อเป็นแหล่งอาหารหรือสารตั้งต้นในการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ด้วย และจากการศึกษาของ Pananikolaou และ Aggelis (2002) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *Yarrowia lipolytica* และได้ประยุกต์ใช้กลีเซอรอลที่เป็นของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม (by-product) มาประยุกต์เป็นแหล่งคาร์บอนโดยการเติมในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตน้ำมัน พบว่าสามารถผลิตน้ำมันได้ 43% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งพบว่าการนำเอาของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลนั้น ยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ดังนั้นในงานวิจัยจึงควรมุ่งเน้นในการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลของจุลินทรีย์ด้วย และควรมุ่งเน้นในการประยุกต์ใช้ของเหลือจากกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ หรือของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์ ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนในการในการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ เนื่องจากอาหารสำเร็จรูปมีราคาสูง และเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากของเหลือใช้ที่มีปริมาณมากด้วย

ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ทำให้มีปริมาณวัตถุดิบทางการเกษตรถูกผลิตขึ้นอย่างมากมาย ส่งผลให้ประเทศไทยมีการพัฒนาอุตสาหกรรมทางการแปรรูปอาหารจากวัตถุดิบทางการเกษตรจำนวนมาก ในปัจจุบันพบว่าการขยายกำลังการผลิตเพื่อการแปรรูปอาหารมากขึ้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการแปรรูปผักและผลไม้ เช่น การผลิตผักและผลไม้กระป๋อง การผลิตเครื่องดื่มจากผักและผลไม้ เป็นต้น และจากการเพิ่มปริมาณการผลิตและจากกระบวนการผลิตการแปรรูปวัตถุดิบจากการเกษตร ส่งผลให้เกิดการเพิ่มปริมาณของวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการผลิตมากขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากมีวัตถุดิบเหลือใช้ในปริมาณมากถูกปล่อยทิ้งไว้

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปสับปะรด เช่น กระบวนการแปรรูปสับปะรดกระป๋องและน้ำสับปะรด ปัจจุบันพบว่าการเพิ่มกำลังการผลิตมากขึ้น โดยมีการผลิตมากกว่า 200,000 ตันต่อปี หรือเทียบเท่าจำนวนสับปะรดกระป๋อง 5 ล้านหีบมาตรฐาน (ข้อมูลจากโรงงานสับปะรดของบริษัทปิโกฟู้ดส์ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)) และจากกระบวนการแปรรูปสับปะรด พบว่ามีวัตถุดิบเหลือใช้ต่าง ๆ มากมาย เช่น กากสับปะรด แขนสับปะรด ใบและเปลือกสับปะรด เป็นต้น ซึ่งพบว่าได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อย และองค์ประกอบที่พบในส่วนเปลือก พบว่ามีโปรตีนประมาณร้อยละ 0.69 ไขมันร้อยละ 0.53 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 2.27 เถ้าร้อยละ 1.01 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 15.0 และส่วนแกนกลางมีโปรตีนประมาณร้อยละ 1.62 ไขมันร้อยละ 1.32 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 7.42 เถ้าร้อยละ 1.97 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 74.73 และปริมาณน้ำตาลที่พบมาก ส่วนใหญ่เป็นพวกซูโครสร้อยละ 70 กลูโคสร้อยละ 20 และฟรุคโตสร้อยละ 10 ซึ่งจากองค์ประกอบดังกล่าว พบว่ามีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตสูง และมีปริมาณโปรตีนต่ำทำให้มีการนำไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารสัตว์ได้น้อย จึงก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมตามมา ดังนั้นการผลิตไบโอดีเซลจากวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปสับปะรดนั้น ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการแก้ปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม และเป็นการพัฒนา ปรับปรุง จนถึงการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบเหลือใช้มาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้ว ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะผลิตไบโอดีเซลให้เพียงพอความต้องการ โดยให้ความสนใจในการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ปริมาณที่มากที่สุดจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว และประยุกต์ใช้กากสับปะรดที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปสับปะรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไบโอดีเซลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือได้อีกทางหนึ่งและเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมได้จากกากสับปะรด
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมจากกากสับปะรดให้มีการผลิตน้ำมันในปริมาณที่มากที่สุด
3. เพื่อหาองค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว
4. เพื่อเพิ่มแหล่งผลิตไบโอดีเซลให้เพียงพอความต้องการ
5. เพื่อศึกษาการเตรียมน้ำมันที่ผลิตได้ให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์เพื่อใช้เป็นไบโอดีเซลได้
6. เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากกากสับปะรดที่เป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปสับปะรด
7. เพื่อเพิ่มมูลค่าของกากสับปะรดที่เป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปสับปะรด

บทที่ 2

หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิพิด (Lipid)

ลิพิด คือ สารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยธาตุหลัก คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน บางครั้งอาจมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสประกอบด้วย มีคุณสมบัติที่สำคัญต่างจากคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนคือ มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เบนซีน อะซิโตน เอทานอล และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ เป็นต้น ดังนั้นในการสกัดแยกลิพิดออกจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตสามารถทำได้โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้ ลิพิดจะพบมากในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ และจะทำหน้าที่แตกต่างกันไปตามชนิดและโครงสร้างทางเคมี

2.1.1 โครงสร้างและสมบัติของลิพิด

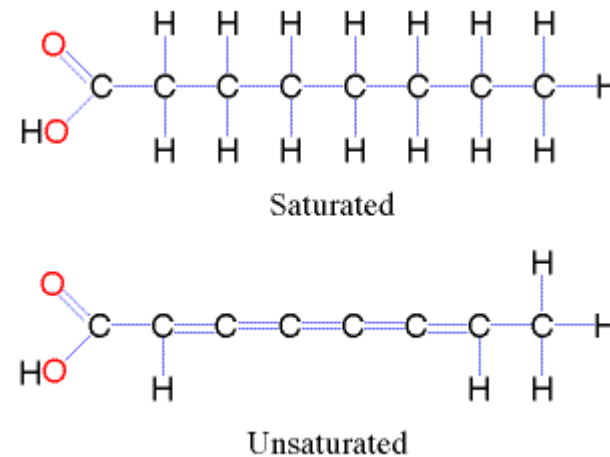
ลิพิดเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์ของแอลกอฮอล์กับกรดไขมัน (fatty acid) มีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลายแต่มีโครงสร้างโดยทั่วไปที่เหมือนกัน (รูปที่ 2.1) คือ จะมีส่วนของโครงสร้างที่เป็นไฮโดรคาร์บอน (CH) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว (non-polar) มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ลิพิดบางชนิดอาจประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (polar) มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ทำให้ลิพิดเหล่านี้มีคุณสมบัติทั้งชอบน้ำและไม่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุล เรียกคุณสมบัติแบบนี้ว่า แอมฟิไฟต์ (amphiphiles) (เป็นภาษากรีกแปลว่า ชอบทั้งคู่) ลิพิดเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่ทำให้ลิพิดที่ไม่ละลายน้ำสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ ลิพิดที่มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิไฟต์ ได้แก่ ฟอสโฟกลีเซอไรด์และสฟิงโกลิพิด

2.1.2 การจำแนกประเภทของลิพิด

เราสามารถจำแนกลิพิดออกได้หลายกลุ่ม ดังนี้

2.1.2.1 แบ่งตามลักษณะของการทำหน้าที่ ได้แก่

- 1 ลิพิดที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน ได้แก่ กรดไขมัน (fatty acid) ไข (waxes) และไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol)
- 2 ลิพิดที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเมมเบรน ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) กลีเซอโรฟอสโฟลิพิด (glycerophospholipids) สเตอรอยด์ (steroids)
- 3 ลิพิดที่ทำหน้าที่อื่นๆ เช่น เป็นตัวให้สัญญาณ (signal) เป็นโคแฟกเตอร์ และสารสี (pigments) ได้แก่ ฟอสฟาติดีลโนสิทอล (phosphatidylinositol) อีโคซานอยด์ (eicosanoids)



Biological Process '94

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดไขมัน

ที่มา : <http://www.biology.lsu.edu/introbio/Link2/fatty%20acids.gif>

2.1.2.2 แบ่งตามโครงสร้างทางเคมี ได้แก่

1 ลิพิดทั่วไป (simple lipid)

เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ถ้าแอลกอฮอล์นั้น คือ กลีเซอรอล (glycerol) จะได้สารประกอบพวกไขมันหรือน้ำมัน (fat หรือ oil) อย่างเช่นที่เรียกว่า นิวทรัลลิพิด (neutral lipid) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ถ้าเป็นแอลกอฮอล์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่กลีเซอรอล จะเป็นสารประกอบพวกขี้ผึ้ง (waxes) เมื่อกรดไขมันรวมตัวกับกลีเซอรอล จะมีการเสียน้ำออกมา 1 โมเลกุล เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ดีไฮเดรชัน (dehydration) เรียกนิวทรัลลิพิดว่า มอโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol) ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) และไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) แล้วแต่ว่ามีกรดไขมันเกาะอยู่กับกลีเซอรอล 1, 2 หรือ 3 โมเลกุลตามลำดับ

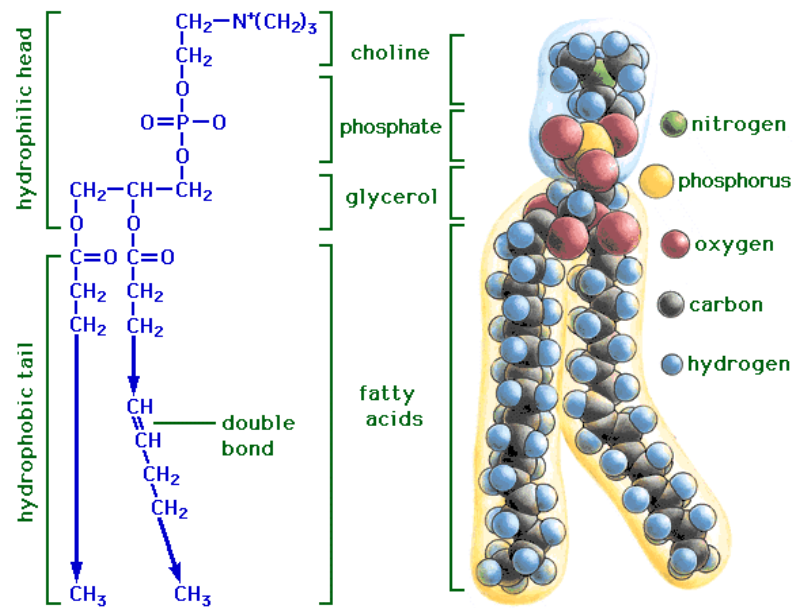
2 ลิพิดเชิงประกอบ (compound lipid)

เป็นลิพิดที่มีสารอื่นเป็นองค์ประกอบด้วย ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ไกลโคลิพิด (glycolipid) และลิโปโปรตีน (lipoprotein)

ฟอสโฟลิพิด เป็นลิพิดที่มีความสำคัญต่อเซลล์ประสาท เป็นสารประกอบที่พบในเซลล์ทุกชนิด ส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังพบในเนื้อเยื่อประสาท ในไขแดง ตัวอย่างของสารประกอบฟอสโฟลิพิด (รูปที่2.2) ได้แก่ เลซิทีน (lecithin) เซฟาลิน (cephalin) พลาสมาโลเจน (plasmalogen)

ไกลโคลิพิด เป็นลิพิดที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ลิพิดชนิดนี้พบที่ อวัยวะหลายแห่ง เช่น สมอง ไต ตับ ม้าม

ลิโปโปรตีนเป็นไขมันที่มีโปรตีน หรือกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบร่วม เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ และช่วยในการลำเลียงลิพิดไปตามกระแสเลือด

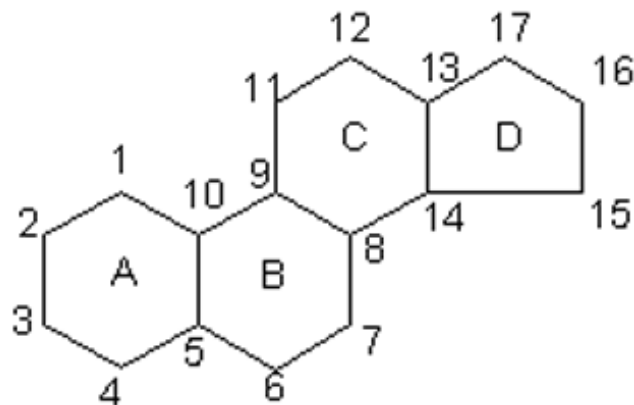


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ phospholipid

ที่มา : http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age2062/lect/lect_06/4_18.GIF

3 ลิพิดอื่น ๆ (derived lipid)

เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างแตกต่างจากลิพิดทั่วไป แต่เนื่องจากมีสมบัติคล้ายลิพิด เช่น ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ จึงถูกจัดไว้ในกลุ่มลิพิด ตัวอย่างอนุพันธ์ลิพิดที่สำคัญ เช่น สเตอรอยด์ มีโครงสร้างทั่วไปเป็นวง 4 วง (รูปที่ 2.3) ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน 17 อะตอม และหมู่ R ซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิดของสเตียรอยด์



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสเตียรอยด์ที่เป็นเพอร์ไฮโดรไซโคลเพนทาโนฟีแนนทริน

ที่มา : <http://www.promma.ac.th/chemistry/MainBridgePage.html>

สเตียรอยด์มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เช่น ฮอรโมนที่สร้างจากรังไข่ อัณฑะ และต่อมต่างๆ เช่น ต่อมหมวกไต คอเลสเตอรอล (cholesterol) ซึ่งมีในสัตว์แต่ไม่มีในพืชเป็นสเตียรอยด์ที่ทำให้เส้นเลือดอุดตัน สเตียรอยด์ที่สำคัญอีกตัวหนึ่ง คือ เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) ซึ่งร่างกายใช้สังเคราะห์วิตามินดี

2.1.3 แหล่งของลิปิด

2.1.3.1 ลิปิดจากพืช

ลิปิด (lipids) ในพืชมีปริมาณผันแปรระหว่างชนิด (species) ไปจนถึงส่วนต่างๆ ของพืช ผลผลิตจากพืชส่วนใหญ่จะมีปริมาณไขมันน้อย ยกเว้นอะโวคาโด (avocados) มะกอก (olives) และพวกเมล็ดชนิดต่างๆ ที่มีไขมันสูง ลิปิดส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของอาหารสะสม โดยเฉพาะในส่วนของเมล็ดจะใช้เป็นแหล่งของพลังงานขณะงอก นอกจากนั้นยังเป็นส่วนประกอบของเมมเบรน (membranes) ต่างๆ รวมไปถึงสารปกคลุมผิว (cuticular waxes) วิตามิน (vitamins) รงควัตถุ (pigments) sterol และ secondary products เช่น rubber

ในทางชีวเคมี ไขมันที่พบในพืชแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้คือ neutral lipids, waxes, phospholipids, glycolipids และ terpenoids สำหรับ neutral lipids นั้นประกอบด้วย ไขมัน และ น้ำมัน ซึ่งเป็นแหล่งของอาหารสะสมในรูปสารประกอบของคาร์บอน (carbon storage compounds) ส่วน ไข เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอนสายยาว หรือ เอสเทอร์ของกรดไขมัน และแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนสายยาว นอกจากนี้ยังอาจพบสารประกอบอื่นๆ ด้วย สารประกอบนี้จะสร้างโครงสร้างเป็นแผ่นไขบางๆ บนผิวของใบ ผลและส่วนอื่นๆ ของพืช ส่วนกรณีของฟอสโฟลิปิดและไกลโคลิปิดนั้นเป็นส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน (cellular membranes) ส่วน terpenoids เป็นสารประกอบ acyclic และ cyclic ที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ steroids, essential oils และ rubber เป็นต้น

ส่วนใหญ่แหล่งของลิปิดในพืชจะอยู่ที่เมล็ดหรือพืชจำพวกตระกูลถั่ว ได้แก่เมล็ดของแคนตาลูป แดงไทย แดงกวา แดงโม ละหุ่ง พิกุล สะเดา กระบก ละมุด และน้อยหน่า เป็นต้น พืชบางชนิดมีส่วนของพืชที่สะสมลิปิด เช่น มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน มะกอก และถั่วเมล็ดแห้งบางชนิด สามารถแบ่งพืชน้ำมันออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มพืชล้มลุก เช่น ทานตะวัน ดอกคำฝอย ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และพืชยืนต้น ได้แก่ มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน โกโก้ นอกจากนี้ยังสามารถสกัดน้ำมันจากรำข้าว ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการสีข้าว เมล็ดหนุ่น เมล็ดฝ้าย จึงได้มีการศึกษาถึงประโยชน์ของกรดไขมันที่สามารถสกัดได้จากพืชเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2.1.3.2 ลิปิดจากสัตว์

ลิปิดที่ได้จากสัตว์มักเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว เนื่องจากการเติมไฮโดรเจนอะตอมเข้าไปไม่ได้ มีจุดหลอมเหลวต่ำ ที่สำคัญมีไลโปโปรตีนชนิดหนาแน่นต่ำ (LDL) สูง อันเป็นสาเหตุของเส้นเลือดอุดตัน เป็นลิปิดชั้นเลว แหล่งที่พบ เช่น น้ำมันหมู และน้ำมันจากสัตว์ปีก ลิปิดพวกนี้จัดเป็นพวกไขมันอันตรายมีไตรเอ-ซิลกลีเซอรอลสูงมาก จึงไม่ควรกินมากเพราะจะทำให้อ้วนและเส้นเลือดอุดตันได้ เป็นไขมันจัดอยู่ในจำพวก Omega-6 ซึ่งแตกต่างจากลิปิดที่ได้จากสัตว์ทะเลไขมันที่ได้จากสัตว์ทะเลเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ไขมันพวกนี้สามารถเติมไฮโดรเจนอะตอมเข้าไปได้อีก มีไลโปโปรตีนชนิดหนาแน่นสูง (HDL) สูงช่วยไม่ให้เส้นเลือดอุดตัน เป็นลิปิดชั้นดีแหล่งที่พบได้แก่ กุ้ง หอย ปู ปลา น้ำมันปลา เรียกว่ากรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว Omega-3 มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่นละลายวิตามิน เอ อี ดี เค เป็นต้น

จากการศึกษาเกี่ยวกับกรดไขมันในสัตว์ พบว่ากรดไขมันจะเป็นพลังงานมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต และสำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ในร่างกายของสัตว์เพื่อบำรุงรักษาไว้ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต กรดไขมันที่สามารถสกัดได้จากสัตว์ เช่น โอเมกา-3 ที่ได้จากปลา และสัตว์น้ำอื่นๆ ยังสามารถสกัดได้จากสัตว์ปีก สัตว์กินพืชได้อีกหลายชนิด (พรรณทิพย์ 2550) ตัวอย่างไขมันของเนื้อปลาทะเลประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid, SFA) พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วงร้อยละ 29.1-51.4 ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวตำแหน่งเดียว (monounsaturated fatty acid, MUFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid, PUFA) มีปริมาณร้อยละ 8.5-42.4 และ 19.6-58.7 ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบ docosahexaenoic acid (DHA) และ eicosapentaenoic acid (EPA) ที่พบมีค่าอยู่ในระหว่างร้อยละ 15.9-47.3 และ 0.9-13.5 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์พบว่าไขมันของปลาทะเลมีองค์ประกอบที่เป็น EPA ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ

กับอาหารชนิดอื่นในหมู่เดียวกัน ได้แก่ เนื้อสัตว์อื่นๆ ไข่ นม ถั่วเหลือง กล่าวคือไม่พบ EPA ในไข่ไก่ทั้งฟอง และไข่แดง แต่พบในไข่ขาว 2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และไม่พบ EPA ในน้ำมันวัวและถั่วเหลือง การวิเคราะห์ วิตามินเอ อี ซึ่งเป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน พบว่าเนื้อปลาทะเล 100 กรัม มีวิตามินเอ และอี เท่ากับ 0-184 I.U. และ 0.12-0.74 I.U. ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์วิตามินบีหนึ่ง บีสอง และไนอาซิน ซึ่งเป็นวิตามินที่ ละลายน้ำ พบว่าในเนื้อปลาทะเล 100 กรัม มีค่าอยู่ระหว่าง 0.19-1.03 มิลลิกรัม 0.02-0.24 มิลลิกรัม และ 1.68-3.08 มิลลิกรัม ตามลำดับ ส่วนเนื้อปลาน้ำจืดพบว่าวิตามินบีหนึ่ง บีสองและไนอาซินมีค่าระหว่าง 0.01-0.44 มิลลิกรัม 0.05-0.28 มิลลิกรัม และ 0.59-1.85 มิลลิกรัม ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทาง อาหาร องค์ประกอบกรดไขมัน และวิตามินในเนื้อปลา แสดงให้เห็นว่าปลาเป็นอาหารที่มีคุณค่าทาง โภชนาการสูง คือ มีปริมาณโปรตีนสูง และไขมันที่มีในเนื้อปลาประกอบด้วยกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อ สุขภาพ ได้แก่ EPA และ DHA ซึ่งพบในระดับสูง รวมทั้งยังพบวิตามินที่สำคัญต่อการควบคุมการทำงานของ ร่างกายให้ทำหน้าที่ได้ตามปกติ ได้แก่ วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง เป็นต้น

2.1.3.3 ลิปิดจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตไขมันได้ซึ่งไขมันที่ได้จากจุลินทรีย์ จะเรียกว่า ไขมันเซลล์เดี่ยว (single cell oil) ส่วนใหญ่เป็นไขมันที่บริโภคได้ มีองค์ประกอบของไขมันคล้ายกับไขมันจากพืช จุลินทรีย์ที่ สามารถผลิตไขมันได้เรียกว่า จุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganisms) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมัน ได้นั้นมีทั้งยีสต์ รา สาหร่าย และแบคทีเรีย

1 สาหร่าย (Algae)

สาหร่ายเป็นแหล่งลิปิดที่ดีซึ่งสามารถผลิตไขมันได้สูงถึงร้อยละ 85 โดยน้ำหนักแห้ง สามารถใช้ คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน แต่มีการเจริญเติบโตช้าต้องใช้แสงสว่างและพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง และปัญหาในการกำจัดคลอโรฟิลล์ออกและต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวสูง ไขมันที่ได้มีจำนวนคาร์บอน 12-22 อะตอมต่อโมเลกุล สาหร่ายหลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดไขมันที่มีคุณภาพสูงใน *Porphyridium* sp. จะมีการสังเคราะห์ Arachidonic acid (C20:4) Linoleic acid (C18:2) Linolenic acid (C18:3) Eicosapentaenoic acid (C20:5) สามารถนำไขมันที่ได้ไปใช้เป็น Hyperlipidemia เพื่อลดระดับคลอ-เรสเตอรอลในเลือดและใช้เพื่อการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนานำไปใช้เป็นน้ำมัน เชื้อเพลิง แต่พบว่ายังไม่เหมาะสมเนื่องจากbyproductต่างๆที่ปนเปื้อนในน้ำมันที่ได้เป็นปัญหาต่อเครื่องยนต์ (Backer,1994)

2 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถเลี้ยงได้ในถังหมักแต่จะให้ปริมาณเซลล์และไขมัน ต่ำเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ องค์ประกอบของกรดไขมันมีความซับซ้อนซึ่งยุ่งยากต่อการสกัด และมี แนวโน้มก่อให้เกิดโรคหรือมีสารพิษปนกับไขมันที่ได้ จึงไม่นิยมผลิตไขมันจากแบคทีเรีย (Hammond และ Glatz,1988) การผลิต Docosahexaenoic acid (DHA) จากแบคทีเรียนับว่าน่าสนใจอย่างยิ่ง เพราะ สามารถนำเทคโนโลยีชีวภาพที่ทันสมัยมาช่วยในการผลิตได้

Yano และคณะ (1994) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาทะเลน้ำลึกที่สามารถผลิต DHA ได้ถึง 5 สายพันธุ์ โดยจะให้การผลิต DHA ร้อยละ 6.4 -11.6 ของกรดไขมันทั้งหมด หรือประมาณ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร Yasawa และคณะ (1988) คัดเลือกได้แบคทีเรียแกรมลบซึ่งให้รหัสว่า SCRC-8132 สามารถผลิต EPA ได้เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียสและถ้าเลี้ยงที่ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้ EPA เพิ่มขึ้นร้อยละ 40 ของไขมันทั้งหมด

Akimoto และคณะ (1990) พบว่าที่ 8 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสายพันธุ์ SCRC-2738 ให้การผลิต EPA ได้ในปริมาณ 16.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งแต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิเป็น 25 องศาเซลเซียสจะได้ EPA เพียง 7.3 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

2 ราและยีสต์ (Moulds and Yeasts)

ราและยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันได้สูงสุดเมื่อเทียบกับ จุลินทรีย์ชนิดอื่น ไขมันที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็น C₁₆ และ C₁₈ ซึ่งเหมือนกับไขมันจากพืชแต่ต่างกันที่การจัดเรียงตัวของกรดไขมันในองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ โดยราและยีสต์จัดเป็นแหล่งไขมันที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงการเลี้ยงไม่ต้องใช้พื้นที่มาก ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้น ไขมันที่ได้ไม่มีปัญหาสารพิษปนเปื้อนและสามารถสกัดไขมันออกจากเซลล์ได้ง่ายกว่าในแบคทีเรีย (Laning, 1991)

Shimizu และคณะ (1988) พบว่ารา *Mrtierella alpine* 20-17 เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิต EPA ได้ดีโดยที่ 12 องศาเซลเซียส ปริมาณ EPA ที่ผลิตได้เท่ากับ 29 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้งและ Shirasaka และ Shimizu (1995) ได้ศึกษารา *Saprolegnia* sp. 28YTE-1 ที่แยกจากน้ำ พบว่ารานี้สามารถผลิตกรด Eicosapentanoic acid (EPA) และกรด Arachidonic acid (AA) ได้ โดยสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น ทั้งแป้ง เดกซ์ทริน น้ำตาลทราย น้ำตาลกลูโคส และน้ำมันมะกอกโดยที่น้ำมันมะกอกนั้นจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสามารถใช้ผลิต EPA ได้ 17 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์แห้ง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 20 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจุลินทรีย์ไขมันสูงดังแสดงใน ตารางที่ 2.1

2.1.4 การใช้ประโยชน์จากลิปิดในระดับอุตสาหกรรม

จากการศึกษาปริมาณลิปิด และองค์ประกอบกรดไขมันในเมล็ดพืช 346 ตัวอย่าง ทำการเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ โดยทรานซ์เมทิลเลชันเมล็ดพืชโดยตรงด้วยกรด วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี พบปริมาณลิปิดในช่วงร้อยละ 0.28-65.0 โดยน้ำหนักแห้ง ประมาณร้อยละ 40 ของจำนวนพืชที่ศึกษามีปริมาณลิปิดสูงกว่าร้อยละ 15 ซึ่งสูงพอสำหรับพัฒนาใช้ในระดับอุตสาหกรรม กรดไขมันสามัญที่พบในเมล็ดพืชทุกชนิด คือ กรดไลโนเลอิก โอเลอิก ปาล์มิติก และสเตียริก โดยที่กรดไลโนเลอิก และโอเลอิกเป็นกรดไขมันหลัก ส่วนกรดปาล์มิติก และสเตียริก พบในปริมาณที่ต่ำกว่า ได้แบ่งแนวทางการประยุกต์ใช้น้ำมันพืชในอุตสาหกรรม 3 ด้านคือ เป็นอาหาร เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซล และโอเลโอเคมีคอล เมล็ดพืชที่เหมาะสมเป็นแหล่งน้ำมันสำหรับบริโภคได้แก่ แคนตาลูป แตงไทย แตงกวา และแตงโม ซึ่งเป็นพืชในจีนัส Cucumis และ หนุมานนึ่งแทนเพราะองค์ประกอบมีกรดไขมันอิ่มตัวในสัดส่วนที่ต่ำ เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันเมล็ดพืชหลายชนิดในจีนัส Citrus (โดยเฉพาะส้ม) พิกุล สะเดา กระบก ละมุด และน้อยหน่ามีค่าดัชนีชี้เทนสูงเหมาะที่จะพัฒนาเป็นแหล่งเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซล สำหรับกระบก หนุมานนึ่งแทน มะรุม และท้อ เมล็ดน้ำมันที่สามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรม โอเลโอเคมีคอลได้ ในเมล็ดหมากหมก มะระไทย และเข็มขาว พบกรดไขมันที่มีโครงสร้างไม่ปกติ ในปริมาณที่สูง แต่เมสสเปคตร้าของกรดไขมันดังกล่าวที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ไม่พบสูตรโครงสร้างใน Bureau Standard

ลิปิดเป็นสารที่มีความหลากหลายและมีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และ organelle membrane ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเซลล์ทั้ง permeability และ fluidity เป็นต้นเป็นสารตัวกลาง (precursor) ที่สำคัญของ signal transduction pathway และ ลิปิดยังเป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับเซลล์อีกด้วย จากประโยชน์เหล่านี้จึงทำให้ลิปิดได้รับความสนใจจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ทางด้านการแพทย์ ทั้ง biomedical pharmaceutical และอุตสาหกรรมอาหาร (essential fatty acids) นอกจากนั้นลิปิดยังได้รับความสนใจนำไปเป็นสารทดแทนในอุตสาหกรรมทางด้าน oleochemicals เช่น การนำไปใช้ผลิต polymers lubricants และ biofuels เป็นต้น โดย

การนำเอาลิปิดไปใช้ประโยชน์ทางด้าน oleochemicals นี้มีมากถึง 200 ล้านเมตริกตันต่อปี และความต้องการใช้ลิปิดยังมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นในอนาคตอีกด้วย จากความต้องการที่มีอยู่มากนี้จึงได้มีความพยายามที่จะนำเอรา (fungi) เช่น *Mortierella alpine* และ *Mucor rouxii* มาเป็นทางเลือกในการผลิตลิปิดเพิ่มเติม นอกเหนือจากแหล่งผลิตที่มีอยู่เดิม เช่น พืช จำพวก blackcurrant borage palm-kernel coconut rape seed และ evening primrose เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามปริมาณที่ผลิตจากพืชเหล่านี้ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ และมีราคาสูงมาก เนื่องจากปริมาณการผลิตที่ขึ้นอยู่กับทั้งฤดูกาลและสภาพอากาศ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องค้นหาแหล่งผลิตใหม่ที่ดีขึ้นและแหล่งผลิตที่น่าสนใจคือ จุลินทรีย์

ตารางที่ 2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ไขมันสูงซึ่งสามารถผลิตไขมันได้ร้อยละ 40-80 โดยน้ำหนักแห้ง

แบคทีเรีย	ยีสต์	รา	สาหร่าย
<i>Antrobacter</i> sp.	<i>Cryptococcus cervatus</i>	<i>Entomophthora conica</i>	<i>Botryococcus branuii</i>
	<i>C. tericolus</i>	<i>Cunninghamella elegans</i>	<i>Dunaliella salina</i>
	<i>Candida</i> NCYC 911	<i>Mortierella isabelina</i>	<i>Nanochoris</i> sp.
	<i>Lipomyces lipofer</i>	<i>M. pusilla</i>	<i>Monalantus salina</i>
	<i>L. starketi</i>	<i>M. vinasea</i>	<i>Chlorella pylinoidosa</i>
	<i>L. tetrasporus</i>	<i>Mucor circinelloides</i>	
	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	<i>M. plumbeus</i>	
	<i>Rhodotolura glutinis</i>	<i>M. mucedo</i>	
	<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Pythium ultimum</i>	
	<i>Endomycopsis variabilis</i>	<i>A.oryzae</i>	
		<i>Chaetomium globosum</i>	
		<i>Fusarium bulbigenum</i>	
		<i>Oidium lactis</i>	
		<i>Gibberella fugikoloi</i>	
		<i>Humicola lanuginose</i>	
		<i>Penicillium lilacinum</i>	
		<i>P. spinurosum</i>	
		<i>Cladosporium herbarum</i>	
		<i>Claviceps purpurea</i>	
		<i>Austiliago zeae</i>	

ที่มา : Leman (1997)

2.2 ยีสต์ผลิตไขมันสูง หรือยีสต์ โอเลจิเนส (Oleagenous Yeasts)

2.2.1 ลักษณะของไขมันจากยีสต์ไขมันสูง

ยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันได้มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้งขึ้นไปจัดเป็นยีสต์ไขมันสูง ชนิดและปริมาณของไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ สารอาหาร และสภาวะต่างๆที่ใช้ในการเลี้ยงเช่น พีเอช อุณหภูมิเป็นต้น ดังตารางที่ 2.2 และองค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์โอเลจิเนสดังแสดงในตารางที่ 2.3

2.2.2 ชนิดของไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงได้แก่

1 ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol)

ไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลอาจถูกแทนที่ด้วยกรดไขมันตั้งแต่ 1 2 และ 3 ตำแหน่งซึ่งอาจเรียกว่า โมโน ได หรือ ไตรกลีเซอไรด์ตามลำดับ โดยไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นผลผลิตหลักที่อยู่ในรูปหยดไขมันเล็กๆภายในเซลล์ต้องทำให้เซลล์แตกก่อนจึงสกัดออกมาได้ ไตรเอซิลกลีเซอรอล ที่ได้จะมีกรดโอเลอิก (C 18:1) ร้อยละ 40-50 กรดปาล์มิติก (C 16 : 1) ร้อยละ 20-30 กรดสเตียริก(C 18 : 0) ร้อยละ15และกรดลิโนเลอิก(C 18:2) กลีเซอไรด์เป็นไขมันที่พบมากที่สุดที่เซลล์คือ มีร้อยละ80 ของไขมันทั้งหมด กลีเซอไรด์ที่พบมากที่สุดในยีสต์ คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งกรดไขมันในไตรเอซิลกลีเซอรอล ในยีสต์ที่พบนั้นมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-24 อะตอม โดยชนิดที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอม จะพบมากที่สุดซึ่งมีทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว องค์ประกอบของไขมันในยีสต์ไขมันสูงดังตารางที่ 2.4 และเมื่อเปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับกรดไขมันจากพืชพบว่าจะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันดังแสดงในตารางที่ 2.5

2 ฟอสโฟลิปิด (phospholipid)

ฟอสโฟลิปิดเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล และมีหมู่กรดฟอสฟาติก ฟอสโฟลิปิดที่พบในธรรมชาติเป็น L- form เป็นส่วนสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เมมเบรน โดยฟอสโฟลิปิดในยีสต์เป็นฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidyl choline) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งพบว่ามีปริมาณร้อยละ 25-35 ของฟอสโฟลิปิดทั้งหมด และส่วนน้อยจะเป็นพวกฟอสฟาติดีลอินโนซิทอล (phosphatidyl inositol) และฟอสฟาติดีลเซอรีน(phosphatidyl serine)

3 ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon)

ในยีสต์พบไฮโดรคาร์บอนในปริมาณไม่มากนัก มีรายงานว่าพบสควอรีน(squalene)(C₃₀)ในยีสต์ *Sacchromyces cerevisiae* และใน *Sacchromyces carlsbergensis* สควอรีนนี้นั้นเป็นสารตั้งต้นของ สเตียรอยด์

4 สฟิงโกลิปิด (sphingolipid)

สฟิงโกลิปิดเป็นไขมันที่มีสายยาว (long chain base) ซึ่งมีกรดไขมันต่อกับหมู่อะมิโนด้วยพันธะเอไมด์ ซึ่งรวมเรียกว่า เซราไมด์ (ceramide) และมีหมู่เพิ่มเข้ามาคือ หมู่ฟอสเฟต (PO₄³⁻) และไนโตรเจนเบส (nitrogen base) เช่นโคลีน (choline) สฟิงโกลิปิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์เมมเบรน สฟิงโกลิปิดแบ่งออกเป็น 3 ชนิดด้วยกันคือ สฟิงโกไมอีลิน(sphingomyelin) เซเรโบรไซด์ (cerebrosides) และแกงกลิโอไซด์ (gangliosides) ในยีสต์พบเฉพาะเซเรโบรไซด์สฟิงโกลิปิดที่พบส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์ของไฟโตสฟิงโกซีน (phytosphingosines) และได้ไฮโดรสฟิงโกซีน (dihydrosphingosine) อย่างไรก็ตามการพบสฟิงโกซีนในยีสต์มักจะอยู่รวมกับสารประกอบอื่นๆในรูปไกลคอล (glycol) และอินโนซิทอล ฟอสฟอริลสฟิงโกลิปิด (inositol phosphoryl sphingolipids)

ตารางที่ 2.2 ยีสต์ผลิตน้ำมันสูง

สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณไขมันสูงสุด (ร้อยละ)
<i>Candida</i> sp. 107	45
<i>Candida curvata</i> D	58
<i>Candida curvata</i> R	51
<i>Candida didensiae</i>	37
<i>Cryptococcus (tericolus) albidus</i> var.albidus	65
<i>Cryptococcus albidus</i> var.aerius	63
<i>Cryptococcus laurentii</i>	32
<i>Endomycopsis vernalis</i> ^a	65
<i>Hansenula ciferri</i> ^b	22
<i>Hansenula sarturnus</i>	28
<i>Lipomyces lipofer</i>	64
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	67
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	51
<i>Rhodotolura glutinis</i> (<i>gracillis</i>)	72
<i>Rhodotolura graminis</i>	41
<i>Rhodotolura mucilaginososa</i> ^b	28
<i>Trichosporon ceutanium</i>	45
<i>Trichosporon pullulans</i> ^a	33
<i>Trigonopsis variables</i>	40
<i>Yarrowia</i> (<i>Candida</i> , <i>Saccharomycopsis</i>) <i>lipolytica</i> (<i>palalipolytica</i>) ^b	36

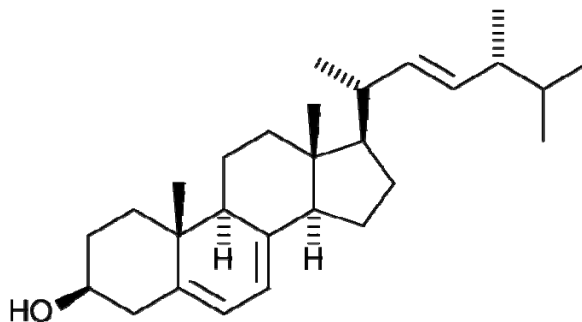
หมายเหตุ ^a คาดว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน

^b ยังไม่ชัดเจนว่าเป็นยีสต์ที่มีไขมันสูงหรือไม่

ที่มา : Ratledge and Tan (1990)

5 สเตียรอยด์ (steroid compound)

สเตียรอยด์เป็นอนุพันธ์ของไซโคลเพนตาโนไฮโดรฟีแนนทรีน (cyclopentanohydrophenanthrene) โดยในยีสต์พบทั้งในรูปอิสระและในรูปเอสเทอร์ประมาณร้อยละ 0.1-1.0 ของไขมันทั้งหมดในยีสต์ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็น เออโกสเตอรอล (ergosterol) (รูปที่ 2.4) และไซโมสเตอรอล (zymosterol)



รูปที่ 2.4 โครงสร้าง เออโกสเตอรอล

ที่มา: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5d/Ergosterol_structure.svg/800px-Ergosterol_structure.svg.png

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จาก โอลิจินีสยีสต์ที่เลือกมา

ยีสต์	ความสัมพันธ์ขององค์ประกอบ % (w/w)								
	TAG	DAG	MAG	FFA	S	SE	PL	GL	Ref
<i>Cryptococcus (terricola) albidus</i> var. <i>albidus</i>	92	2.5	1	3	1	1	2	-	11
<i>Lipomyces starkeyi</i>	95	1	-	<1	1	-	3	-	12
<i>Rhodotorula glutinis</i>	67		-	4	2	7	11	6	13
<i>Trichosporon pullulans</i>	82	1	-	-	10	1	4	-	14

หมายเหตุ: TAG : ไตรเอซิลกลีเซอรอล : MAG : โมโนเอซิลกลีเซอรอล : FFA : กรดไขมันอิสระ : S: สเตอรอล
:SE : สเตอรอลเอสเทอร์ PL: ฟอสโฟลิปิด : GL : ไกลโคลิปิด

ที่มา : Ratledge and Tan (1990)

ตารางที่ 2.4 กรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูง

ยีสต์	ความสัมพันธ์% (w/w)										
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	18:4	20:0	22:0	23:0	24:0
<i>Candida sp. 107</i>	44	5	8	31	9	1	-	-	-	-	-
<i>Candida curvata</i>	25	-	10	57	7	-	-	-	-	-	-
<i>Candida diddensii</i>	19	3	5	45	17	5	1	-	-	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	16	1	3	56	-	3	-	7	12	-	-
<i>Endomycopsis vernalis</i>	15	-	2	57	24	1	-	-	-	-	-
<i>Hansenula saturnus</i>	16	16	-	45	16	5	-	-	-	-	-
<i>Lipomyces lipofer</i>	37	4	7	48	3	-	-	-	-	-	-
<i>Lipomyces starkeyi</i>	34	6	5	51	3	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

<i>Lipomyces tetrasporus</i>	31	4	15	43	6	1	-	-	-	-	-
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	18	3	3	66	-	-	-	-	-	3	6
<i>Rhodotorula glutinis</i>	10	9	-	19	44	16	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula gracillis</i>	14	2	4	26	49	3	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon cutaneum</i>	13		22	50	13	-	-	-	-	-	-

ที่มา : Ratledge and Tan (1990)

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับไขมันจากพืชน้ำมัน

แหล่งไขมัน	ปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ (ร้อยละ)ของกรด								
	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0
<i>Candida</i> 107	2	3	37	1	11	35	8	0	3
Palm oil	2	3	39	2	6	38	10	0	0
<i>Rhodotorula gracillis</i>	0	1	18	1	6	41	24	1	9
Soybean oil	0	0.1	10.5	0	3.2	22.3	54.5	8.3	0.2
Safflower oil	0	0.1	6.7	0	2	12.9	77.5	0	0.5
Corn oil	0	0	11.5	0	2.2	26.6	58.7	0.8	0.2
Olive oil	0	0	16.9	18	2.7	61.9	14.8	0.6	0.4
Rapeseed oil	0	0.1	4	0.1	1.3	17.4	12.7	5.3	0.9
Kapok oil	0	0	19.5	3.5	3.9	38	30.9	1	0
Groundnut oil	3	5	20	2	7	43	18	0	0

ที่มา : Ratledge and Tan (1981)

2.1.3 ตัวอย่างยีสต์โอลิจินัส

1 ยีสต์ *Rhodotorula glutinis*

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis เป็นยีสต์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม basidiomycetous โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการสร้างสี รวมไปถึงคุณสมบัติทางเมตาบอลิก บางประการ เช่น การใช้อินโนซิทอล (inositol) เป็นต้น ในการจัดจำแนก

R. glutinis เป็นยีสต์สีแดง(รูปที่ 2.4) ที่พบทั่วไปในดินและน้ำ มีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยวมีรูปร่างหลายแบบ คือ เซลล์มีรูปร่างกลม (spheroidal) รูปไข่ (ovoidal) หรือทรงยาว (elongate) จัดเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ(aerobe) มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อหลายทิศทาง (multilateral budding) สร้างเส้นใยที่แท้จริง (true mycelium) แต่ไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์(ascospores) บางครั้งพบว่าการสร้างแคปซูล (capsule) จึงทำให้ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก และโคโลนีที่ปรากฏจะมีสีส้มจนถึงแดง มีเมือก

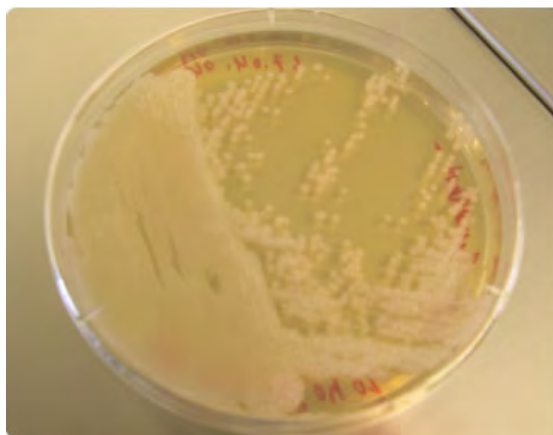
โดยจากการศึกษาพบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ช่วงพีเอชเท่ากับ 6 และมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน *R. glutinis* เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ malt agar จะไม่สามารถใช้อินโนซิทอล (inositol) รวมไปถึงอาหารที่มีส่วนประกอบมาจากแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และขาดคุณสมบัติการหมัก (non-fermenting)



รูปที่ 2.5 *Rhodotorula glutinis*

ที่มา http://www.doctorfungus.org/Thefungi/img/rho1_L.jpg

2 ยีสต์ *Yarrowia lipolytica*



รูปที่ 2.6 ลักษณะของยีสต์ *Y. lipolytica*

ที่มา : http://www.px-therapeutics.com/image_interface/cell_bank2.jpg

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Yarrowia lipolytica*

ชื่ออาณาจักร : Fungi

ชื่อไฟลัม : Ascomycota

ชื่อสับไฟลัม : Saccharomycotina

ชื่อชั้น : Saccharomycetes

ชื่ออันดับ : Saccharomycetales

ชื่อวงศ์ : Dipodascaceae

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Y. lipolytica*

Y. lipolytica (เดิมมีชื่อว่า *Candida*, *Endomycopsis* หรือ *Saccharomyces lipolytica*) คัดแยกได้จากอาหารต่าง ๆ เช่น ชีส ไข่กรอก ผลิตภัณฑ์นม โซยุ สลัดที่มีเนื้อหรือกุ้ง หรือในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ โดยเฉพาะบริเวณที่มีน้ำมัน จัดเป็นยีสต์พิเศษ (non-conventional yeast) มีความแตกต่างจากยีสต์ที่เรารู้จักทั่วไป คือ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Schizosaccharomyces pombe* ในด้านวิวัฒนาการเจริญ สรีระวิทยา พันธุศาสตร์ และโมเลกุลทางชีววิทยา ลักษณะการเจริญของเชื้อเป็นแบบไดมอร์ฟิก คือมีทั้งระยะแฮฟลอยด์และดิพลอยด์ ส่วนใหญ่จะพบในระยะแฮฟลอยด์แต่ระยะดิพลอยด์จะเสถียรกว่า มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง 4 แอสโคสปอร์ในแอสคัส โดยจะเจริญต่อไปเป็นยีสต์ ซูโดไมซีเลียม หรือไมซีเลียมที่แท้จริงนั้นขึ้นกับสภาวะในการเจริญของเชื้อ ต้องการอากาศในการเจริญอย่างแท้จริง (Obligate aerobe) ไม่จัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรค

Rosario และ Angel (1986) ศึกษาองค์ประกอบผนังเซลล์โดยการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าผนังเซลล์ยีสต์ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 70 น้ำตาลอะมิโนร้อยละ 7 โปรตีนร้อยละ 15 ลิพิดร้อยละ 5 และฟอสฟอรัสร้อยละ 0.8 ส่วนผนังเซลล์ไมซีเลียมประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 70 น้ำตาลอะมิโนร้อยละ 14 โปรตีนร้อยละ 6 ลิพิดร้อยละ 5 และฟอสฟอรัสร้อยละ 0.6 จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบที่พบไม่แตกต่างกันแตกต่างกันเพียงปริมาณแต่ละองค์ประกอบ รวมทั้งพบ โพลีแซ็กคาไรด์ 3 ชนิดทั้งในผนังเซลล์ยีสต์และไมซีเลียม คือ เบต้า-กลูแคน แมนแนน และโคติน ที่ประกอบไปด้วยไกลโคโปรตีน รวมเรียกว่า แมนโนโปรตีน (mannoprotein)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและผลผลิตโดยเชื้อยีสต์

ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดไขมันนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตได้แก่

ปัจจัยทางด้านอาหาร (Nutrition factors)

1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนจำเป็นอย่างยิ่งในการสังเคราะห์ตัวเซลล์ คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก โปรตีน แหล่งพลังงานของเซลล์ และที่สำคัญคือใช้ในการสังเคราะห์ลิพิด ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิด เช่น กลูโคส ไฮโดรคาร์บอน กากน้ำตาล อะซิเตท กลีเซอรอล พาราฟิน กรดไขมันและน้ำมันธรรมชาติ เป็นต้น การเจริญของยีสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามปริมาณการใช้กลูโคส การสะสมลิพิดจะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญของเซลล์ ในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตลิพิดต้องการแหล่งคาร์บอนปริมาณสูงเพื่อให้เซลล์นำไปเปลี่ยนเป็นลิพิด

2 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์ยีสต์มีความต้องการไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ และอนินทรีย์เพื่อนำไปใช้สังเคราะห์ กรดอะมิโนสำหรับโปรตีน พิวรีน และไพริมิดีนสำหรับกรดนิวคลีอิก กลูโคซามีน (glucosamine) สำหรับโคติน และวิตามินต่างๆ แหล่งของไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารสำหรับผลิตลิพิดอยู่ในรูปอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ เปปโตน ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ข้าวมอลต์ สารสกัดยีสต์ และหางนม ส่วนแหล่งของอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และแอมโมเนีย เป็นต้น ชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้งสองรูปแบบอาจใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ร่วมกัน แต่แหล่งไนโตรเจนต้องใช้ในปริมาณจำกัด ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อควรอยู่ที่ประมาณ 0.5-1.0 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ปัจจัยทางกายภาพ (Physical factors)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เพียงแต่ส่งผลในด้านการสังเคราะห์สารเท่านั้นยังส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วย เนื่องจากยีสต์บางสายพันธุ์สามารถผลิตกรดซิตริกได้ส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดต่ำลง ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อนี้ลดลงจึงควรตรวจสอบและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมตลอดการเพาะเลี้ยง โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-6.0 มีผลทำให้การเจริญของเชื้อและผลผลิตมากที่สุด

อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์ลิปิดของเซลล์ พบว่าที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเชื้อและสังเคราะห์ลิปิดมากที่สุด

ออกซิเจน

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ที่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างแท้จริง (obligate aerobe) ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้อากาศ เซลล์จะใช้อากาศช่วยปรับปรุงการถ่ายโอนมวลสารของจุลินทรีย์ระหว่างสารตั้งต้น ผลิตภัณฑ์ และออกซิเจน

การเจริญและการสร้างลิปิด

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญและการสังเคราะห์ลิปิดพบว่า เชื้อจะมีการสังเคราะห์ลิปิดสะสมไว้ในเซลล์ไปพร้อมกับการเจริญ มีปริมาณเซลล์และลิปิดสูงสุดเมื่อยีสต์เข้าสู่การเจริญช่วงสุดท้ายของระยะ exponential phase หรือช่วงต้นระยะ stationary phase ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ผลผลิตได้ ปริมาณเซลล์ต้องการอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง ปริมาณไนโตรเจนสูงนั้นเหมาะต่อการเจริญหรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่ในช่วงการผลิต ลิปิดเซลล์ต้องการคาร์บอนสูงเพื่อเปลี่ยนเป็นลิปิด การจำกัดปริมาณไนโตรเจนเซลล์จะลดการใช้ NADPH ในการสังเคราะห์โปรตีนหรือการเจริญ และเมื่อมีการสะสมของ NADPH มากขึ้น จะทำให้เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ลิปิดได้สูงขึ้น

2.3 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือ การเปลี่ยนไตรเอซิลกลีเซอรอลให้เป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (mono alkyl ester) ได้แก่ เมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) หรือเอทิลเอสเทอร์ (ethyl ester) และกลีเซอริน (glycerine) หรืออาจกล่าวได้ว่า เป็นกระบวนการแยกกลีเซอรินออกจากน้ำมันนั่นเอง ไบโอดีเซลคือ เชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลที่ผลิตได้จาก น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือแม้แต่ไขมันที่ใช้อยู่แล้ว ซึ่งได้รับการกำจัดยางเหนียวและสิ่งสกปรกออก และนำไปผ่านกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่า Transesterification โดยการเติมแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือเอทานอลและตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ภายใต้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม เพื่อเปลี่ยนไขมันหรือเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันจากโมโนอัลคิลเอสเทอร์ชนิดนี้มีลักษณะคล้ายน้ำมันดีเซล เราเรียกเอสเทอร์ดังกล่าวนี้ว่า ไบโอดีเซล หรือ B100 ส่วนกลีเซอรินที่ได้จากการผลิต ถือเป็นผลพลอยได้ใช้เป็นวัตถุดิบ สำหรับอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง น้ำมันหล่อลื่น เป็นต้น

2.3.1 ประเภทของไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลที่มีการผลิตได้มีอยู่ 3 ประเภทใหญ่ คือ

2.3.1.1 ไบโอดีเซล (Straight vegetable oil) ที่ใช้น้ำมันของพืช หรือไขมันจากสัตว์

โดยตรง

โดยใช้น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม หรือ น้ำมันจากสัตว์ เช่น น้ำมันหมู บดลงไปเครื่องยนต์ดีเซล โดยไม่ต้องผสมหรือเติมสารเคมีอื่นใด สิ่งสำคัญของการใช้น้ำมันพืชโดยตรง คือ ต้องมีการอุ่นน้ำมันใน

ทุกจุดที่มีน้ำมันผ่านได้แก่ ถังน้ำมัน ท่อทางเดินน้ำมัน ชุดกรองน้ำมัน อุณหภูมิของน้ำมันที่อุ่นอย่างน้อย 70°C และแนวทางในการนำน้ำมันพืชมาใช้โดยตรงถือว่าเป็นวิธีการที่ได้น้ำมันในราคาถูกที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำน้ำมันพืชซึ่งยังไม่ผ่านกระบวนการกลั่นมาใช้ แต่การที่จะนำมาใช้ได้อย่างเหมาะสมจำเป็นต้องอาศัยความร้อนในการหลอมเหลวไขแข็ง และลดความหนืดของน้ำมัน เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลประมาณ 11-17 เท่า และที่อุณหภูมิตัวน้ำมันพืชจะมีความหนืดสูงขึ้นเป็นลำดับจนเกิดเป็นไข การที่น้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้หัวฉีดน้ำมันฉีดน้ำมันให้เป็นฝอยได้ยาก เกิดเป็นอุปสรรคต่อการป้อนน้ำมันเชื้อเพลิงเข้าสู่ห้องเผาไหม้ และเกิดการสันดาปไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ น้ำมันพืชมีคุณสมบัติที่ระเหยตัวกลายเป็นไอได้ช้าและน้อยมาก ยิ่งทำให้เกิดการจุดระเบิดได้ยาก เครื่องยนต์ติดยาก และหลงเหลือคราบเขม่าเกาะที่หัวฉีด ผนังลูกสูบ แหวนและวาล์ว จากคุณสมบัติที่น้ำมันพืชมีความหนืดสูงและระเหยตัวได้ต่ำกว่าน้ำมันดีเซลนี้ ทำให้เกิดความยุ่งยากเมื่อใช้น้ำมันพืชโดยตรงในเครื่องยนต์

2.3.1.2 ไบโอดีเซลแบบลูกผสม (Veggie / Kero Mix)

เป็นการผสมน้ำมันพืช หรือน้ำมันจากสัตว์กับ “น้ำมันก๊าด” หรือ “น้ำมันดีเซล” เพื่อลดความหนืดของน้ำมันพืชลง เพื่อให้ได้ไบโอดีเซลที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ “น้ำมันดีเซล” ให้มากที่สุด เช่น ไบโอดีเซลที่ผสมกับน้ำมันมะพร้าว เรียกว่า โคโคดีเซล (cocodiesel) อัตราส่วนผสมมีตั้งแต่ 10 % น้ำมันก๊าดและ 90 % น้ำมันพืช จนถึง 40 % น้ำมันก๊าด 60 % และน้ำมันพืช อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมอยู่ที่ 20 % น้ำมันก๊าด 80 % น้ำมันพืช อย่างไรก็ตามหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้น้ำมันพืชผสมน้ำมันก๊าด สามารถติดตั้งถังน้ำมันดีเซลหรือน้ำมันไบโอดีเซลเพื่อใช้ในการสตาร์ทเครื่องยนต์และก่อนเลิกใช้งานเครื่องยนต์ ปัจจุบันมีการนำวิธีดังกล่าวไปใช้งาน แต่เนื่องจากราคาของน้ำมันก๊าดค่อนข้างสูงทำให้ใช้ปริมาณของน้ำมันก๊าดน้อยเกินไป ทำให้น้ำมันผสมที่ได้เมื่อนำไปใช้จึงเกิดผลกระทบต่อเครื่องยนต์จากปัญหาการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันผสม นอกจากนี้เพื่อใช้ในการเครื่องยนต์ดีเซลที่ไม่มีการดัดแปลงเครื่องยนต์ จึงต้องเลือกชนิดน้ำมันพืชชนิดของตัวทำละลาย และสัดส่วนผสมที่เหมาะสมกับพื้นที่และฤดูกาลที่ใช้ เพื่อให้เกิดความสะดวกในการใช้และไม่เกิดความยุ่งยากต่างๆตามมา เช่น การเกิดไขในท่อส่งน้ำมัน ทำให้เกิดการอุดตัน เป็นต้น

2.3.1.3 ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์

เป็นความหมายของ “ไบโอดีเซลที่แท้จริง” และเป็นที่ยอมรับในสากล และมีการใช้อย่างทั่วไป เช่น สหพันธรัฐเยอรมัน สหรัฐอเมริกา มีคำจำกัดความว่า เป็นเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเหมือนกับ “น้ำมันดีเซล” มากที่สุดทำให้ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์ ได้น้ำมันที่มีความคงตัวมากขึ้น สามารถนำไปเติมในเครื่องยนต์ดีเซลได้ทุกชนิด ทั้งเติมโดยตรงและผสมลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่างๆ เช่น B5 หมายถึงการผสมไบโอดีเซลต่อน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 5:95 หรือ B100 ซึ่งเป็นน้ำมันไบโอดีเซล 100 % เป็นต้น แต่ปัญหาคือ ต้นทุนการผลิตมีราคาแพงกว่าเมื่อเทียบกับไบโอดีเซลแบบอื่นๆ ปัจจุบันราคาของน้ำมันไบโอดีเซลยังสูงกว่าน้ำมันดีเซล 1-2 เท่าตัว อย่างไรก็ตามการนำมาใช้กับเครื่องยนต์มักจะนำน้ำมันดีเซลมาผสมด้วย ซึ่งได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในระบบขนส่งมวลชน เนื่องจากเป็นน้ำมันที่มีราคาไม่ต่างจากน้ำมันดีเซลมากนัก นอกจากนี้เผาไหม้ได้อย่างสมบูรณ์ไม่มีเขม่าควันหลงเหลือให้เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เชื้อเพลิงชนิดนี้ มีความหนืดใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล และมีความคงตัว ความหนืดเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยน จุดวาบไฟของไบโอดีเซล มีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้มีความปลอดภัยในการใช้และการขนส่ง นอกจากนั้นแล้ว ค่าซีเทน ที่เป็นดัชนีบอกถึงคุณภาพการติดไฟของไบโอดีเซล ยังมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซล

ไบโอดีเซลประเภทนี้เกิดจากการปฏิกิริยาระหว่าง น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว กับ แอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นกรดหรือด่าง โดยปกติในน้ำมันพืชประกอบไปด้วยกรดไขมันอิสระ (free fatty acid), phospholipids, sterols, น้ำ และสิ่งเจือปนอื่นๆ ดังนั้นในการนำน้ำมันมาใช้เป็นเชื้อเพลิง จำเป็นต้องผ่านกระบวนการต่างๆเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสายโซ่ตรง

และหนึ่งในกระบวนการนั้น คือ ปฏิกิริยา Transesterification (หรือปฏิกิริยา alcoholysis) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันจากไตรเอซิลกลีเซอรอล ให้เป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (mono alkyl ester) ได้แก่ เมทิล เอสเทอร์ (methyl ester) หรือ เอทิล เอสเทอร์ (ethyl ester) และกลีเซอริน (glycerine หรือ glycerol)

2.3.2 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ โดยการสกัดกลีเซอรอลออกจากแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล เรียกกระบวนการนี้ว่า Transesterification โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) เป็นกรด ต่าง NaOH KOH หรือ เอ็นไซม์ ขึ้นอยู่กับคุณภาพและส่วนประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ เพื่อให้ได้ โมโนอัลคิลเอสเทอร์ (mono alkyl ester) หรือเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) เมื่อน้ำมันพืชถูกเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์แล้วขนาดโมเลกุลจะลดลงเหลือ 1 ใน 3 เป็นผลทำให้ความหนืดของน้ำมันลดลงอย่างมากใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล

2.3.3 การควบคุมคุณภาพไบโอดีเซล

คุณภาพของไบโอดีเซลนอกจากจะขึ้นกับกระบวนการผลิตแล้วยังขึ้นกับชนิดของน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ที่ใช้ เนื่องจากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์แต่ละชนิดจะประกอบด้วยกรดไขมันประเภทต่างๆในปริมาณสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปกรดไขมันที่พบในไบโอดีเซลจะมีสายโซ่มากกว่า 10 ชนิด (คือมีคาร์บอน C 12-C 22) และร้อยละ 90 จะมี สายโซ่คาร์บอนระหว่าง 16-18 ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของกรดไขมันอิ่มตัว (saturated) หรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated) หรือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงพหุ (polyunsaturated) โดยชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันนี้จะมีอิทธิพลต่อสมบัติของไบโอดีเซลที่ได้ ไบโอดีเซลที่ดีจะผลิตจากวัตถุดิบที่มีกรดไขมันอิ่มตัวเท่านั้น

2.3.4 มาตรฐานสากลของไบโอดีเซล

ตั้งแต่ยุคปี 1990 เป็นต้นมา มีการเปิดโรงงานเพื่อผลิตน้ำมันไบโอดีเซลหลายแห่งในเขตยุโรป เช่น ฝรั่งเศส เยอรมัน สวีเดน โดยนำไบโอดีเซลไปผสมกับดีเซลปกติในอัตรา 5% ซึ่งในปัจจุบันมีถึง 21 ประเทศที่มีการตั้งโรงงานเพื่อผลิตไบโอดีเซลเชิงพาณิชย์ สำหรับในอเมริกา มลรัฐมินเนโซต้า เป็นรัฐแรกที่ออกกฎหมายท้องถิ่นที่กำหนดให้น้ำมันดีเซลที่ขายในรัฐนั้น จะต้องมีส่วนผสมของไบโอดีเซลในอัตราอย่างต่ำ 2% แต่ในอเมริกานั้น ยังไม่อาจให้ข้อรับประกัน (warranty) สำหรับชิ้นส่วนของเครื่องยนต์ต่างๆ ที่เปลี่ยนมาใช้ไบโอดีเซล

มาตรฐานสากลสำหรับไบโอดีเซล คือ EN 14214 นอกจากนี้ยังมีมาตรฐานอื่นที่นิยมใช้กันในอเมริกา และแคนาดา คือ ASTM D 6751 สำหรับในเยอรมัน จะใช้ DIN EN 14214 ส่วนในอังกฤษนั้นมาตรฐานของไบโอดีเซลจะกำหนดไว้ใน BS EN 14214 มาตรฐานสำหรับไบโอดีเซลเหล่านี้ถูกกำหนดขึ้นมาเพื่อให้มั่นใจได้ว่าผู้บริโภคจะไม่พบปัญหาในการใช้ไบโอดีเซลเหล่านั้นกับเครื่องยนต์ โดยในอเมริกามีการจัดโครงการ “BQ-9000 biodiesel quality program” เพื่อให้การรับรองแก่บริษัทต่างๆ ที่เป็นผู้จำหน่ายไบโอดีเซล

ตารางที่ 2.6 ASTM standard

Test parameter	Method	Typical	ASTM D6751 Specification
Flash point , ° C	D-93	180-225	130 Min.
Metal and Sediment ,Vol%	D-2709	< 0.05	0.05 Max.
Carbon residue, Wt%	D-4530	0.03-0.05	0.05 Max.
Sulfated ash,Wt%	D-874	< 0.001	0.02 Max.
Viscosity 40 ° C, CST	D-445	3.5-4.5	1.9-6.0
Sulfur , Wt%	D-5453	0.01-0.0460	0.05 Max.
Cetane	D-613	47.4-48	47 Min.
Cloud point, ° F	D-2500	25-30	REPORT
Copper corrosion	D-130	1A	NO.3 Max.
Acid number, KOH/gm	D-664	0.16-0.3	0.80 Max.
Free glycerin,Wt%	D-6584	< 0.01	0.02 Max.
Total glycerin,Wt%	D-6584	< 0.01	0.24 Max.
Phosphorus, PPM	D-4951	3-5	10 Max.

ที่มา : http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/prod_quality.pdf

2.4 สับปะรด (จาร์พันธ์, 2519)

2.4.1 ลักษณะทั่วไป

สับปะรด เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในแฟมิลีโบรมีเลอซี (family Bromeliaceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ananas comosus* ซึ่งเป็นพืชที่มีใบประเภทอัมม่น้ำ และมีดอกแยกเป็นสามส่วน ใบยาวขึ้นเป็นเกลียวรอบต้น พืชในตระกูลโบรมีเลอซี นี้ประกอบด้วย 2,000 สปีชีส์ จากจำนวนจิ้นส์ ทั้งหมด 46 จิ้นส์และทั้งหมดของพืชในตระกูลนี้เป็นพืชที่ขึ้นในเขตร้อนและร้อนชื้น โดยมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกา มีเพียงหนึ่งสปีชีส์ ที่พบในทวีปอาฟริกาตะวันตก สับปะรดที่เราคุ้นเคยและรับประทานกันมีเพียง สปีชีส์เดียว มีบางสปีชีส์ ที่ปลูกเพื่อใช้ทำเป็นเส้นใย บางชนิดใช้ปลูกเป็น ไม้ประดับ และเป็นอาหารสัตว์ พืชอีกชนิดหนึ่งชื่อ Bromeliads เป็นไม้ประดับของทวีปอเมริกา จัดเป็นพืชโบราณที่มีวิวัฒนาการเช่นเดียวกับสับปะรด พืชโบราณซึ่งจัดเป็นบรรพบุรุษของสับปะรดบางจิ้นส์ อาจมีความสูงถึง 10 เมตร พืชในจิ้นส์ เหล่านี้ทั้งหมดเป็นพืชที่ขึ้นบนบก มีลำต้นยาว มีรากจำนวนมาก ใบแคบ และมีขนเพื่อช่วยลดการสูญเสียน้ำ ปัจจุบันสับปะรดได้แพร่กระจายไปยังเขตร้อนและร้อนชื้นทั่วโลก ส่วนใหญ่เป็นการปลูกเพื่อบริโภคผลสด และทำเป็นน้ำผลไม้ สับปะรดที่ปลูกกันทั่วไปจะมีความสูงประมาณ 1 เมตร ลำต้นสั้นใบและก้านดอกจะขยายยาว แผลงปลูกสับปะรดที่ใหญ่ที่สุดคือที่รัฐฮาวายของสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีพื้นที่ปลูก 1 ใน 3 ของโลก และผลิตสับปะรดกระป๋องได้ถึงร้อยละ 60 ของโลก รองลงไปได้แก่ จีน บราซิล และเม็กซิโก

2.4.2 ประโยชน์ของสับปะรด

1 ผลสับปะรด

ผลสับปะรดซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเนื้อและน้ำนั้นมีประโยชน์มากมาย ตั้งแต่การบริโภคผลสด รวมถึงเป็นสินค้าส่งออกต่างประเทศ นอกจากนี้ยังนำส่วนเนื้อสับปะรดมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ สับปะรดกวน สับปะรดอบแห้ง สับปะรดในน้ำเชื่อม (บรรจุกระป๋อง) และแยมสับปะรด เป็นต้น ในส่วนน้ำสับปะรดที่คั้นได้สามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ เครื่องดื่มน้ำสับปะรด ไวน์ และน้ำส้มสายชู เป็นต้น

2 หน่อหรือจุกสับปะรด

หน่อสับปะรด คือ ส่วนที่แตกขยายออกจากลำต้นเดิม จุกสับปะรด คือ ส่วนที่อยู่บนยอดผลสับปะรด ทั้งหน่อและจุกสับปะรด สามารถใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์ได้เช่นเดียวกัน ส่วนใหญ่แล้วจะนิยมใช้หน่อในการพันธุ์ เนื่องจากต้นโตเร็ว และได้ผลผลิตเร็วกว่าการใช้จุกขยายพันธุ์

3 ลำต้น

ลำต้นหรือเหง้าสับปะรด สามารถนำมาสกัดเอนไซม์โบรมิเลน เพื่อมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ รวมทั้งนำมาเข้าเครื่องยาสมุนไพรเพื่อทำยารักษาโรคได้

4 ใบ

ปกติชาวไร่สับปะรดจะฟันใบสับปะรดในช่วงก่อนบังคับการออกดอก ซึ่งเศษใบที่ฟันนั้นมีประโยชน์ในการคลุมหน้าดินและย่อยสลายเป็นปุ๋ยในแปลงสับปะรดต่อไป นอกจากนี้ ในปัจจุบันใบสับปะรดเป็นเศษวัสดุที่มีมูลค่า เนื่องจากมีการนำใบสับปะรดมาแปรรูปเป็นผ้าใบสับปะรด เป็นผ้าพื้นเมืองของประเทศฟิลิปปินส์ และกระดาษใบสับปะรด ซึ่งกำลังเป็นที่ต้องการของตลาด เพราะสามารถนำไปประดิษฐ์เป็นสิ่งของเครื่องใช้อื่นๆ ได้อีกมากมาย

5 เปลือก

เปลือกสับปะรดที่เหลือจากโรงงานแปรรูปสับปะรด มีประโยชน์มาก เนื่องจากส่วนตาที่เปลือกสับปะรดนั้นอุดมด้วยสารอาหารที่มีคุณค่า จึงมีการนำเปลือกสับปะรดมาเป็นอาหารของโค และสามารถอบแห้งเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์อื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาทำเป็นน้ำปุ๋ยชีวภาพได้เป็นอย่างดี

6 แกน

แกนสับปะรดคือ ส่วนที่อยู่กลางผลต่อจากก้าน ปกติไม่นิยมนำมารับประทานสด เพราะเนื้อสัมผัสแข็งกระด้าง จึงได้นำมาแปรรูปเป็นแกนสับปะรดอบแห้ง และแกนสับปะรดหี เพื่อเพิ่มมูลค่าได้อีกส่วนหนึ่ง

2.4.3 องค์ประกอบทางเคมีของสับปะรด

องค์ประกอบทางเคมีของสับปะรดแสดง ดังตารางที่ 2.7

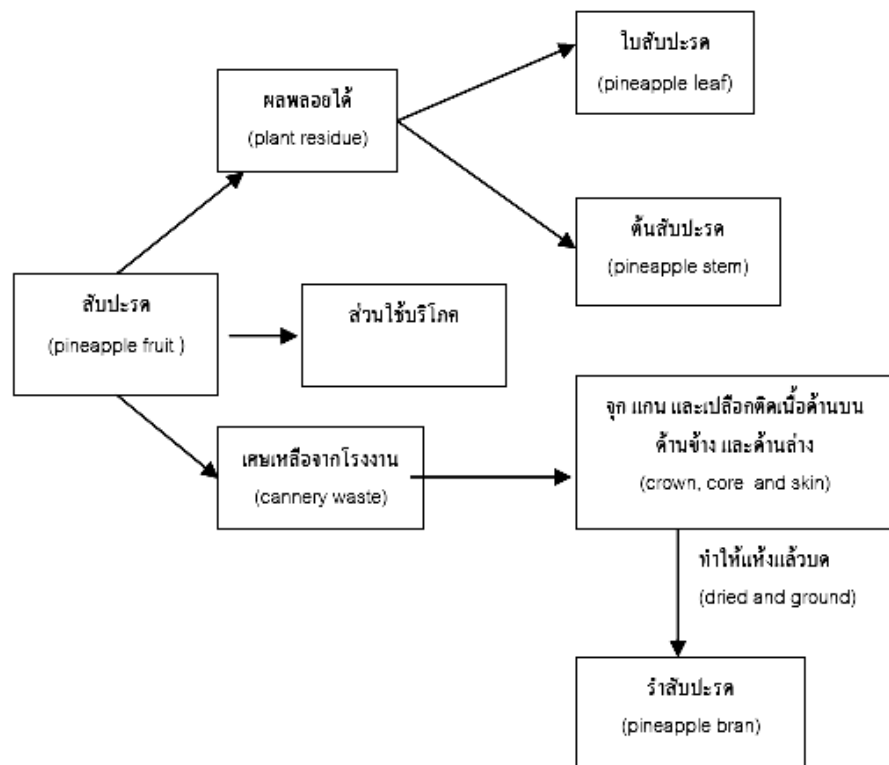
ตารางที่ 2.7 ส่วนประกอบทางเคมีแยกวิเคราะห์ตามส่วนต่างๆ ของสับปะรด (ร้อยละของวัตถุแห้ง)

ส่วนประกอบ	เปลือกด้านข้าง	ส่วนหัว	ส่วนล่าง	แกน(ไส้)	เศษเนื้อ
ความชื้น	85.8	84.9	85.9	88.6	84.5
โปรตีน	4.4	4.1	5.4	3.2	3.6
ไขมัน	1.5	1.2	1.4	1.3	1.2
เยื่อใย	8.1	11.6	13.4	8.9	4.7
เถ้า	4.9	5.4	7.6	3.8	4.2
NFE	81.1	77.7	72.2	82.8	86.3
NDS	72.9	61.2	53.1	73.1	85.5
NDF	27.1	38.8	46.9	26.3	14.5
ADF	12.1	17.1	20.4	12.2	5.8
ADL	1.7	1.9	2.8	0.7	0.6
Cellulose	10.4	15.2	17.6	11.5	5.2
Hemicellulose	15.0	21.7	26.5	14.1	8.7

ที่มา : จินดา, 2547

2.4.4 ปริมาณผลพลอยได้และเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการแปรรูปสับปะรด

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศ สับปะรดที่นิยมปลูกและมีคุณสมบัติเหมาะสม คือมีสัดส่วนของผลที่ใช้ประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจสูง และส่งโรงงานเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย จากการศึกษาของสมบัติและคณะ (2539) รายงานว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีสัดส่วนของต้นสับปะรดคิดเป็น น้ำหนักผลร้อยละ 37.35 ใบร้อยละ 38.78 จุกร้อยละ 7.77 ส่วนของต้น ก้านผลและหน่อเท่ากับ ร้อยละ 12.86, 3.08 และ 0.18 ตามลำดับ มาลี (2521) รายงานผลสับปะรดเมื่อเข้าโรงงาน จะทำการปลิดจุกและก้านออกคิดเป็นน้ำหนักประมาณร้อยละ 30 ของน้ำหนักทั้งผล



รูปที่ 2.7 แสดงผลพลอยได้และเศษเหลือจากโรงงานทำสับปะรดกระป๋อง
ที่มา : จินดา, 2547

สับปะรดหนึ่งผลจะหนักประมาณ 1,754.4 กรัมต่อผล ผลผลิตต่อไร่ประมาณ 3,870 กิโลกรัมต่อไร่ สับปะรดหนึ่งผลเมื่อเข้าแปรรูปในโรงงาน จะมีเศษเหลือใช้จากการทำสับปะรดกระป๋องประมาณ 1,228.1 กรัมต่อผล ในพื้นที่ 1 ไร่ จะได้เปลือกสับปะรดเฉลี่ย 2,700.55 กิโลกรัม หรือถ้าคิดเป็นปริมาณเปลือกทั้งประเทศประมาณ 2.8 ล้านตัน ส่วนของใบสับปะรดประมาณ 4.0 ล้านตันและจุกประมาณ 0.370 ล้านตัน (สมบัติและคณะ, 2537)

2.4.4.1 กากสับปะรด (pineapple waste)

1 ปริมาณผลพลอยได้และเศษเหลือ

กากสับปะรดเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการแปรรูปสับปะรด เช่น สับปะรดกระป๋อง และผลิตภัณฑ์อื่นๆ มีโรงงานแปรรูปสับปะรดเกิดขึ้นหลายโรงงาน เศษเหลือที่จากการแปรรูปสับปะรด จะประกอบด้วย ส่วนเปลือก แกนกลาง และเศษเนื้อสับปะรดปนกัน

สับปะรดเมื่อเข้าโรงงานจะทำการปลิดจุกและก้านออกคิดเป็นน้ำหนักประมาณร้อยละ 30 ของน้ำหนักทั้งผล สับปะรดหนึ่งผลจะหนักประมาณ 1,754.4 กรัม/ผลผลผลิตต่อไร่ประมาณ 3,870.00 กิโลกรัม/ไร่ สับปะรดหนึ่งผลเมื่อเข้าแปรรูปในโรงงาน จะมีเศษเหลือใช้จากการทำสับปะรดกระป๋องประมาณ 1,228.1 กรัม/ผล ในพื้นที่ 1 ไร่ จะได้เปลือกสับปะรดเฉลี่ย 2,700.55 กิโลกรัม หรือถ้าคิดเป็นปริมาณเปลือกทั้งประเทศประมาณ 2.8 ล้านตัน ส่วนของใบสับปะรดประมาณ 4.0 ล้านตันและจุกประมาณ 0.370 ล้านตัน เศษเหลือและผลพลอยได้เหล่านี้จะมีออกมากทุกปีระหว่างเดือน เม.ย.ถึง มิ.ย. และระหว่าง พ.ย.ถึง มี.ค. ในช่วงเวลาอื่นจะมีน้อย (รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2547 กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์)

2 ส่วนประกอบทางเคมีและคุณค่าทางอาหาร

เศษเหลือของสับปะรดจากโรงงานจะมีส่วนประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน กากสับปะรดประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ คือ เปลือกด้านข้าง ส่วนหัว ส่วนล่าง ใ้ (แกนกลาง) และเศษเนื้อ เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า ยังมีคุณค่าทางอาหารอยู่บ้าง คือ ส่วนเปลือก มีโปรตีนประมาณร้อยละ 0.69 ไขมันร้อยละ 0.53 กากร้อยละ 2.27 เถ้าร้อยละ 1.01 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 15.0 ส่วนที่เป็นแกนกลางมีโปรตีนประมาณร้อยละ 1.62 ไขมันร้อยละ 1.32 กากร้อยละ 7.42 เถ้าร้อยละ 1.97 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 74.73 (กรมปศุสัตว์, 2520) อาจจะมีส่วนใดส่วนหนึ่งมากขึ้นกับโรงงาน ซึ่งจะทำให้ส่วนประกอบทางเคมีจากเศษเหลือของสับปะรด หรือเปลือกสับปะรดมีค่าแตกต่างกัน และพบว่าโดยทั่วไปเปลือกสับปะรดสดจากโรงงานแปรรูปสับปะรดกระป๋องจะมีปริมาณน้ำอยู่สูง มีวัตถุแห้งประมาณร้อยละ 10 ถึง 12 มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) อยู่ระหว่าง 3.2 ถึง 3.4 มีเยื่อโภชนะย่อยได้ (total digestible nutrient : TDN) 65 ถึง 74 มีโปรตีนปริมาณแร่ธาตุต่างๆ และวิตามินอี ปริมาณน้ำตาลที่พบมาก ส่วนใหญ่เป็นพวกซูโครสร้อยละ 70 กลูโคสร้อยละ 20 และฟรุคโตสร้อยละ 10 (จินดา, 2547)

3 ข้อดีของกากสับปะรด

1. มีน้ำตาลสูงถึง 6% เป็นแหล่งพลังงานอย่างดี ซึ่งเหมาะที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมัก เช่น การผลิตเอทานอล
2. มีปริมาณของเส้นใยสูง
3. ราคาถูกเมื่อเทียบกับคุณค่าทางอาหารที่ได้โดยสามารถเก็บได้นาน 3 – 4 เดือนและมีให้ตลอดปี
4. เหมาะสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องทุกชนิดเช่น วัวขุน วัวนม แพะ แกะ กวาง ควาย รวมทั้งม้าและนก กระเจือกเทศ เนื่องจากมีกลิ่นหอมทำให้วัวกินอาหารได้มากขึ้นและไม่ทำให้ท้องอืด

4 ประโยชน์ของกากสับปะรด

อาหารสัตว์

จากการสังเกตของผู้เลี้ยงโคไกล่ ๆ โรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปสับปะรด บริเวณที่ทางโรงงานนำกากและสิ่งเหลือจากโรงงานไปทิ้ง พบว่าโคที่เลี้ยงในบริเวณนั้นชอบไปกินอยู่ประจำในต่างประเทศจึงมีการใช้กากสับปะรดและส่วนที่เหลืออื่นๆ ผสมกับอาหารสัตว์ชนิดอื่นใช้เป็นอาหาร สำหรับเลี้ยงโคได้ผลมาแล้ว และได้มีผู้พยายามทดลองใช้ผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น กากสับปะรดเป็นอาหารสัตว์ และใช้ NPN (Non-Protein Nitrogen) เป็นแหล่งของไนโตรเจนบางส่วนในอาหารปรากฏว่าได้ผลดี สามารถลดค่าใช้จ่ายเนื่องจากอาหารลงได้มากโดยเฉพาะในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ 2520)

ปัญหา

กากสับปะรดที่เหลือจากโรงงานแปรรูปสับปะรดสามารถนำมาเป็นส่วนผสมในการทำปุ๋ยหมัก โดยผสมร่วมกับวัสดุทางการเกษตรอื่น ๆ เช่น กากอ้อยจากโรงงานน้ำตาล ชุยมะพร้าวจากโรงงานกะเทาะมะพร้าว กากมันสำปะหลังจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง เปลือกผลไม้จากโรงงานอาหารกระป๋อง เป็นต้น เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีที่จะต้องสั่งซื้อมาจากต่างประเทศใน ราคาแพงและเป็นการลดปริมาณกากที่เหลือจากการแปรรูปให้น้อยลงเพื่อลดการเกิดมลภาวะน่าเสีย รวมไปถึงการเป็นแหล่งเพาะแมลงและเชื้อโรคอีกด้วย

การนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมัก

จากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่ากากสับปะรดจากโรงงานแปรรูปสับปะรด มีไฟเบอร์ร้อยละ 29.33 และมีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 5.77 ซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2.10 และน้ำตาล ฟรุคโตสร้อยละ 2.45 เมื่อนำมาศึกษาหาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากกากสับปะรดพบว่า ในการหมักซึ่งผ่านการย่อย (saccharification) โดยใช้เอนไซม์ผสมจะให้เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลสูงขึ้นเมื่อเวลาของการหมักเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอีก เมื่อมีการหมักนานขึ้นอีกเมื่อมีการหมักนานขึ้นใน (นฤมล, 2530)

2.5 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันทั่วโลกประสบปัญหาทางด้านสถานการณ์ราคาน้ำมันปิโตรเลียมในตลาดโลกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้รัฐบาลและประชาชนทั่วไปให้ความสนใจกับพลังงานทดแทน โดยเฉพาะการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel) พบว่าไบโอดีเซลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่ผลิตจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน เช่น น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันพืชและสัตว์ที่ใช้แล้วหรือผลิตได้จากสาหร่าย ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงดีเซลทางเลือก นอกเหนือจากดีเซลที่ผลิตจากปิโตรเลียมโดยมีคุณสมบัติการเผาไหม้เหมือนกับดีเซลจากปิโตรเลียมมาก และสามารถใช้แทนกันได้ คุณสมบัติสำคัญของไบโอดีเซลคือ สามารถย่อยสลายได้เอง ตามกระบวนการทางชีวภาพในธรรมชาติ (biodegradable) และไม่เป็นพิษ (non-toxic) ดังนั้นรัฐบาลจึงมีนโยบายให้มีการส่งเสริมการผลิตและใช้ไบโอดีเซลเพื่อทดแทนพลังงานน้ำมันดีเซล

วัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทย ได้แก่ น้ำมันพืช น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันละหุ่ง น้ำมันงา น้ำมันเมล็ดทานตะวัน น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันพืชใช้แล้ว โดยวัตถุดิบที่ใช้มีผลต่อคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลที่ได้ และจุดมุ่งหมายในยุทธศาสตร์การพัฒนาและส่งเสริมไบโอดีเซล เมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ.2548 โดยตั้งเป้าหมายว่าในปี พ.ศ.2555 สามารถผลิตไบโอดีเซลได้ถึง 8.5 ล้านลิตรต่อวัน โดยให้ความสนใจในการเตรียมไบโอดีเซลแบบลูกผสมหรือผสมบางส่วนเช่น ใช้ไบโอดีเซล 10% ผสมกับน้ำมันดีเซล และปัจจุบันประเทศไทยได้ให้ความสนใจในการผลิตไบโอดีเซลจากเมล็ดสบู่ดำมากขึ้นด้วยเช่นกัน เนื่องจากเมล็ดสบู่ดำเมื่อทำการสกัดแล้ว พบว่าสามารถนำไปใช้ได้กับเครื่องยนต์ได้ทันที โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแปรรูป และพบว่าไม่มีเขม่าติดเครื่องยนต์ด้วย แต่สัดส่วนในการให้น้ำมันประมาณร้อยละ 25-30 เท่านั้น

จากรายงานของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เกี่ยวกับปัญหาและความต้องการในการผลิตและใช้น้ำมันไบโอดีเซลในประเทศไทย โดยพบว่าปริมาณวัตถุดิบ เช่น พืชน้ำมันต่าง ๆ มีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอต่อการตอบสนองตามยุทธศาสตร์ของชาติในการผลิตไบโอดีเซล ทั้งนี้เนื่องจากพืชบางชนิดสามารถเพาะปลูกได้ยาก ไม่สามารถเพาะปลูกได้ทุกพื้นที่ในประเทศไทย ทำให้จำกัดอยู่ในบางพื้นที่เท่านั้น ทำให้ผลผลิตที่ได้ในแต่ละปีไม่เพียงพอต่อความต้องการ นอกจากนี้ในการเพาะปลูกพืชบางชนิดจะให้ผลผลิตตามฤดูกาล และพบว่าดินฟ้าอากาศยังเป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะปลูกพืชด้วย ซึ่งส่งผลทำให้ราคาของวัตถุดิบของพืชน้ำมันมีราคาสูง และทำให้การผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมันมีต้นทุนสูง

ตามไปด้วย รวมถึงสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการแปรรูปน้ำมันพืชยังมีราคาสูง ปัจจุบันราคาของไบโอดีเซลจึงสูงกว่าน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม ทำให้ยังไม่สามารถที่แข่งขันราคากับน้ำมันดีเซลได้อย่างเต็มที่ และนอกจากนี้สายพันธุ์ของพืชน้ำมันในประเทศไทย พบว่ายังเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตน้ำมันได้ในปริมาณน้อย ดังนั้นนักวิจัยได้พยายามศึกษาการปรับปรุงพันธุ์พืชน้ำมันให้มีการผลิตน้ำมันเพิ่มมากขึ้น และได้พยายามหาแหล่งพืชน้ำมันชนิดใหม่ เพื่อเป็นแหล่งใหม่ในการผลิตน้ำมันสำหรับกระบวนการผลิตไบโอดีเซลของไทย และที่สำคัญในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ คือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตคือ กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) พบว่าในการผลิตไบโอดีเซลจะได้กลีเซอรอลถึงร้อยละ 10 ซึ่งปัจจุบันพบว่ายังไม่สามารถใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลได้อย่างเต็มที่ เนื่องจากกระบวนการทำให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ พบว่าทำได้ค่อนข้างยากและต้องใช้ต้นทุนสูง ทั้งนี้ทำให้กระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีต้นทุนสูงตามไปด้วย

จากข้อจำกัดในการผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมัน นั่นคือวัตถุดิบที่เป็นพืชน้ำมันสำหรับการผลิตไบโอดีเซลที่มีราคาสูง และปริมาณของวัตถุดิบไม่เพียงพอต่อการผลิต ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มปริมาณน้ำมันให้เพียงพอความต้องการ จากการรวบรวมข้อมูลพบว่า สามารถพัฒนาการผลิตน้ำมันที่ได้จากการสังเคราะห์จากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันได้ (microbial oil) ซึ่งอาจเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการแก้ปัญหาในการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยได้ เนื่องจากประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตสารต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็วกว่าพืชน้ำมัน เพราะจุลินทรีย์สามารถผลิตสารได้ตลอดเวลาเมื่อทำการปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตอยู่เสมอ รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสารต่าง ๆ พบว่าจะใช้เวลาที่สั้นกว่าและที่สำคัญสำหรับการผลิตสารจากจุลินทรีย์คือ สามารถทำการขยายปริมาณการผลิตให้มากขึ้นได้ตามที่ต้องการ นอกจากนี้พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ตามที่ต้องการเพียงแค่ปรับสภาวะหรือบังคับให้การสังเคราะห์สารของจุลินทรีย์ไปในทิศทางที่ต้องการได้ จากการศึกษาและรวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายของ Chisti (2007) พบว่าสาหร่ายที่มีขนาดเล็ก (microalgae) หรือ microalgal oil สามารถผลิตน้ำมันที่เป็นวัตถุดิบสำหรับกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้ เนื่องจากสาหร่ายมีความสามารถในการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) จากบรรยากาศ เพื่อเปลี่ยนไปเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายค่อนข้างต่ำ และจุดประสงค์ของการผลิตน้ำมันเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายนี้เพื่อแข่งขันกับราคาไบโอดีเซลจากปิโตรเลียม พบว่าสาหร่ายที่สามารถผลิตน้ำมันเพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลได้แก่ *Botryococcus braunii* (25-75% ต่อน้ำหนักแห้ง) *Chlorella* sp. (28-32% ต่อน้ำหนักแห้ง) *Cryptocodinium cohnii* (20% ต่อน้ำหนักแห้ง) *Dunaliella prinolecta* (23%), *Nannochloropsis* sp. (31-68% ต่อน้ำหนักแห้ง) *Neochloris oleoabundans* (35-54% ต่อน้ำหนักแห้ง) *Nitzschia* sp. (45-47% ต่อน้ำหนักแห้ง) *Schizochytrium* sp. (50-77% ต่อน้ำหนักแห้ง) (Chisti, 2007; Roessler และคณะ, 1994; Sawasyama และคณะ, 1995; Dunahay และคณะ, 1996; Sheehan และคณะ, 1998; Bannerjee และคณะ, 2002; Gavrilescu และ Chsiti, 2005) เป็นต้น และจากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโดยการผลิตใน photobioreactor พบว่าสาหร่ายสามารถผลิตน้ำมันได้สูงถึง 80% ต่อน้ำหนักแห้ง (Spolaore และคณะ, 2006) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ต่างกันเช่น น้ำมันไฮโดรคาร์บอน หรือสารประกอบของลิพิดอื่น ๆ ดังนั้นจะได้ว่าสาหร่ายทุกชนิดไม่สามารถที่จะผลิตสารเพื่อให้สำหรับการผลิตไบโอดีเซลอย่างเดียว (Metzger และ Largeau, 2005; Guschina และ Harwood, 2006) ซึ่งต้องศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตน้ำมันเพื่อใช้เตรียมเป็นไบโอดีเซลอย่างต่อเนื่องต่อไป

นอกจากนี้พบว่าการผลิตไขมันและน้ำมันสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วย เช่น จากเชื้อราหรือยีสต์ โดยเฉพาะในกลุ่มที่เป็น oleaginous microorganism ซึ่งเป็นเชื้อราและยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำมันได้ จากการรายงานของ Certik และ Shimizu (1999) พบว่าเชื้อราในตระกูล Zygomycetes ซึ่งเป็น

oleaginous fungi สามารถผลิตกรดไขมันที่มีสายคาร์บอนยาว ๆ (polyunsaturated fatty acid, PUFAs) โดยผลิตในรูปไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เช่นในกลุ่ม Mucurales ได้แก่ *Mucor circinelloides* หรือ *M. javanicus* พบว่าสามารถผลิตน้ำมันได้ประมาณ 20% ของน้ำหนักแห้ง และผลิตกรดไขมันชนิด γ -linolenic acid (GLA) ได้ 15-18% ของปริมาณของไขมันที่ผลิตได้ ซึ่งเป็น PUFA ที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้ผสมในอาหาร (food additive) หรือผสมในอาหารเพื่อสุขภาพ (health food) และประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางค์ (Ratledge, 1992) และ Nakabara และคณะ (1992) พบว่าเชื้อ *Mortierella isabellina* สามารถผลิตไขมันได้ 83 กรัมต่อลิตร โดยประกอบด้วย GLA 4.5% ของปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Papanikolaou และคณะ (2004) พบว่าเชื้อสามารถผลิตน้ำมันได้มากขึ้นเมื่อมีการจำกัดปริมาณของแหล่งไนโตรเจน โดยผลิตน้ำมันได้มากถึง 50-55% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และต่อมาได้ศึกษาการผลิตไขมันจากเชื้อ *Mortierella ramanniana* ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ พบว่าสามารถผลิตไขมันได้มากกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม 30 กรัมต่อลิตรและผลิต GLA ได้ 18% ของปริมาณไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้ (Hiruta และคณะ, 1997) และ Chen และ Lui (1997) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันและ GLA จากเชื้อ *Cunninghamella echinulata* จะได้ว่าเชื้อสามารถผลิตน้ำมันได้สูงถึง 69% ของน้ำหนักเซลล์แห้งและผลิต GLA ได้ 11.2-13.4% ของปริมาณน้ำมันทั้งหมด และจากการศึกษาของ Eroshin และคณะ (2000) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันโดยเชื้อ *Mortierella apina* พบว่าเชื้อผลิตน้ำมันได้ 46-60% ของน้ำหนักเซลล์แห้งและผลิตกรดไขมันชนิด arachidonic acid ด้วยซึ่งเป็นกรดไขมันที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง eicosanoid hormone และประยุกต์ใช้ในทางด้านการแพทย์และเภสัช อาหารและเครื่องสำอางค์ด้วย

นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันจากยีสต์เพื่อประยุกต์ใช้เป็นไบโอดีเซลด้วย พบว่าเชื้อยีสต์ในสกุล *Rhodotorula* หลายสายพันธุ์ พบว่าสามารถผลิตไขมันเพื่อประยุกต์เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลได้ด้วย เช่น *R. acheniorum*, *R. aurantiaca*, *R. bacarum*, *R. fujisanensis* เป็นต้น (Perrier และคณะ, 1995) และจากการศึกษาของ Xue และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อยีสต์ 4 ชนิดคือ *Rhodotorula glutinis*, *Candida utilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* 2 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารที่เป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตผงชูรส (monosodium glutamate wastewater) พบว่าเชื้อทั้ง 4 ชนิดสามารถผลิตไขมันได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเชื้อ *R. glutinis* สามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุดคือประมาณ 10% และพบว่าไขมันทั้งหมดที่ผลิตได้เมื่อผ่านกระบวนการ transesterification พบว่าจะได้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl ester) คิดเป็น 92% ของไขมันทั้งหมด โดยเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ผลิตได้ถือว่าเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และจากการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อ *R. glutinis* นี้ พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตคือ ปริมาณของคาร์บอนเป็นสำคัญ ดังนั้นในการพัฒนาเพื่อให้เชื้อสามารถผลิตไบโอดีเซลให้มากขึ้น จึงต้องเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซล

สำหรับในการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์พบว่าได้มีการประยุกต์ใช้ของเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปอาหารหรือจากโรงงานอุตสาหกรรมมาเตรียมเพื่อเป็นแหล่งอาหารหรือสารตั้งต้นในการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ด้วย และจากการศึกษาของ Pananikolaou และ Aggelis (2002) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันจากเชื้อ *Yarrowia lipolytica* และได้ประยุกต์ใช้กลีเซอรอลที่เป็นของเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม (by-product) มาประยุกต์เป็นแหล่งคาร์บอนโดยการเติมในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตน้ำมัน พบว่าสามารถผลิตน้ำมันได้ 43% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งพบว่าการนำเอาของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลนั้น ยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ซึ่งในการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ พบว่าอาหารที่ใช้สำหรับในการเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตน้ำมัน โดยเฉพาะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีความจำเป็นอย่างมากในการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์

น้ำมัน ดังนั้นในงานวิจัยจึงควรมุ่งเน้นในการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตของจุลินทรีย์ด้วย และควรมุ่งเน้นในการประยุกต์ใช้ของเหลือจากกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ หรือของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์ ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนในการในการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ เนื่องจากอาหารสำเร็จรูปมีราคาแพงมาก และเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากของเหลือใช้ที่มีปริมาณมากด้วย

ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ทำให้มีปริมาณวัตถุดิบทางการเกษตรถูกผลิตขึ้นอย่างมากมาย ส่งผลให้ประเทศไทยมีการพัฒนาอุตสาหกรรมทางการแปรรูปอาหารจากวัตถุดิบทางการเกษตรจำนวนมาก ในปัจจุบันพบว่าการขยายกำลังการผลิตเพื่อการแปรรูปอาหารมากขึ้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการแปรรูปผักและผลไม้ เช่น การผลิตผักและผลไม้กระป๋อง การผลิตเครื่องดื่มจากผักและผลไม้ เป็นต้น จากการเพิ่มปริมาณการผลิตและจากกระบวนการผลิตการแปรรูปวัตถุดิบจากการเกษตร ส่งผลกระทบให้มีการเพิ่มปริมาณของวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการผลิตมากขึ้น ซึ่งเป็นส่วนที่นำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยหรือไม่สามารถใช้ประโยชน์สำหรับกระบวนการแปรรูปอาหารได้เลย ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากมีวัตถุดิบเหลือใช้ในปริมาณมากถูกปล่อยทิ้งไว้

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปสับปะรด เช่น กระบวนการแปรรูปสับปะรดกระป๋องและน้ำสับปะรด ปัจจุบันพบว่าการเพิ่มกำลังการผลิตมากขึ้น โดยมีการผลิตมากกว่า 200,000 ตันต่อปี หรือเทียบเท่าจำนวนสับปะรดกระป๋อง 5 ล้านหีบมาตรฐาน (ข้อมูลจากโรงงานสับปะรดของบริษัทบีบีฟู้ดส์ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)) และจากกระบวนการแปรรูปสับปะรด พบว่ามีวัตถุดิบเหลือใช้ต่าง ๆ มากมาย เช่น กากที่คั้นน้ำสับปะรด แขนสับปะรด ใบและเปลือกสับปะรด เป็นต้น ซึ่งพบว่าได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อย เนื่องจากองค์ประกอบของวัตถุดิบเหลือใช้จากสับปะรดนั้นมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตสูง และมีปริมาณโปรตีนต่ำ โดยในส่วนเปลือก มีโปรตีนประมาณร้อยละ 0.69 ไขมันร้อยละ 0.53 กากร้อยละ 2.27 แก้วร้อยละ 1.01 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 15.0 และส่วนแกนกลางมีโปรตีนประมาณร้อยละ 1.62 ไขมันร้อยละ 1.32 กากร้อยละ 7.42 แก้วร้อยละ 1.97 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 74.73 และปริมาณน้ำตาลที่พบมากส่วนใหญ่เป็นพวกซูโครสร้อยละ 70 กลูโคสร้อยละ 20 และฟรุคโตสร้อยละ 10 ซึ่งจากองค์ประกอบดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ ดังนั้นการผลิตไบโอดีเซลจากวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปสับปะรดนั้น ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการแก้ปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม และเป็นการพัฒนา ปรับปรุง จนถึงการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบเหลือใช้มาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้ว ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะผลิตไบโอดีเซลให้เพียงพอับความต้องการ โดยงานวิจัยนี้จะให้ความสนใจในการผลิตน้ำมันสำหรับการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ปริมาณที่มากที่สุดโดยการประยุกต์ใช้กากสับปะรดที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือได้อีกทางหนึ่งและเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป ขณะเดียวกันจากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ พบว่าการผลิตน้ำมันจากเชื้อส่วนใหญ่มีจุดประสงค์ในการผลิตเพื่อประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ อาหารและยา รวมถึงเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางเท่านั้น ยังไม่มีรายงานว่ามีการประยุกต์ใช้หรือแปรรูปน้ำมันที่ผลิตจากเชื้อกลุ่มดังกล่าวเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลกันอย่างกว้างขวาง

ระเบียบวิธีวิจัย ให้แสดงการวางแผนการวิจัย และลำดับขั้นตอนการวิจัย (ถ้ามี)

1. รวบรวมเอกสารและข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซล องค์ประกอบของวัตถุดิบน้ำมันที่นำไปใช้เป็นไบโอดีเซล และศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว
2. ศึกษาวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากสับปะรด โดยทำการเตรียมด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน การย่อยสลายด้วยสารละลายกรด และการใช้เอนไซม์ในการย่อย และหาปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบในอาหารที่เตรียมได้ โดยหาปริมาณของคาร์บอนทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด
3. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมจากกากสับปะรด และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันเพื่อให้สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก โดยการศึกษาผลของปริมาณของจุลินทรีย์เริ่มต้น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารที่เตรียมได้ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว
4. หาวิธีการสกัดน้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้วให้ได้ปริมาณที่มากที่สุด โดยการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม
5. หาองค์ประกอบและปริมาณของน้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้ว โดยวิธี Gas-Liquid Chromatography
6. เตรียมน้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกแล้วให้เป็นไบโอดีเซล โดยการเปลี่ยนให้อยู่ในรูป methyl ester โดยผ่านกระบวนการเกิดปฏิกิริยา transesterification
7. ศึกษาปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา transesterification ของน้ำมันที่ผลิตได้เพื่อให้ไขมันที่ผลิตได้เปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ methyl ester ให้มากที่สุด โดยศึกษาการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปส และปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา trans- esterification
8. วิเคราะห์คุณสมบัติทางเชื้อเพลิงของน้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วเปรียบเทียบกับน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซล
9. เพิ่มปริมาณการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว โดยการขยายขนาดการผลิตให้ใหญ่ขึ้น โดยการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ และผล (output) ที่จะได้ในรอบ 1 ปี

ขั้นตอนดำเนินการวิจัย	ระยะเวลา (เดือน)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. ทบทวนเอกสาร	←→											
2. ศึกษาวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากสับปรด			←→									
3. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมจากกากสับปรดและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมัน					←→							
4. ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว โดยการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม									←→			
5. ศึกษาหองค์ประกอบและปริมาณของน้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้ว											←→	

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วจากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง (YM slant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการ cấyเชื้อใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัท
Yeast extract	Scharlar Chemic S.A.
Malt extract	Scharlar Chemic S.A.
Peptone	HiMedis Laboratory
Glucose	Fluka Bochemical
Agar	Fluka Bochemical

3.3 สารเคมี

สารเคมี	บริษัท
3,5-Dinitrosalicylic (DNS)	Sigma Aldrich
เฮกเซน (hexane)	Asia Pacific Specialty Chemical
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Asia Pacific Specialty Chemical
โบรอนไตรฟลูออไรด์ (BF_3)	Asia Pacific Specialty Chemical

3.4 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัท
กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่าง	Olympus optical
เครื่องเขย่าผสม	Scientific industries, Inc
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	Scientific Promotion
เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดตุนิยม 4 ตำแหน่ง	Mettler-Todedo. Thailand
เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง	United Instrument
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Shimadzu
เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น	Hermle Labortech
ตู้บ่ม	Memmert
ตู้ปลอดเชื้อ	International Scientific Supply
ตู้อบลมร้อน	Sheldon Manufacturing supply
หม้อนึ่งความดัน	Tommy-seiko
โถดูดความชื้น	Glasweek Wertheim รุ่น GL32

อีมาไซโตมิเตอร์
เครื่องแก้ว
ขวดเปียเชื้อ

Mainin
Pyrex
-

3.5 ศักยภาพการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากสับปะรด

3.5.1 การเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน

นำผงแห้งของกากสับปะรดแห้งเติมน้ำกลั่นลงไป แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยการต้มให้เดือดพร้อมกวนตัวอย่างตลอดเวลา จากนั้นปล่อยให้เย็น แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น และนำส่วนใสที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จะได้สารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อต่อไป และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด

3.5.2 การเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดด้วยวิธีการสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2 นอร์มอล

ผงแห้งของกากสับปะรดย่อยสลายด้วยสารละลายกรด ซัลฟูริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ภายใต้หม้อหนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็น และนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนใสที่เตรียมได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาส่วนใส จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เหมาะสมต่อเชื้อ จะได้สารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อใช้อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อต่อไป และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด เช่นเดียวกับสารสกัดจากน้ำร้อน

3.5.3 การเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดด้วยวิธีการสกัดด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ผงแห้งของกากสับปะรดย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสในโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนใสที่เตรียมได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาส่วนใส จะได้สารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อใช้อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อต่อไป และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด เช่นเดียวกับสารสกัดจากน้ำร้อนและการสกัดด้วยสารละลายกรด

3.6 การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลูกปัดเต็มลงในอาหารสำหรับหัวเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่า เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ และล้างเซลล์ยีสต์ที่ติดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเตรียมสารละลายหัวเชื้อในน้ำเกลือ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้สารละลายหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตรที่มีเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.6.2 การเลี้ยงเชื้อในสารสกัดจากกากสับปะรด

นำสารสกัดจากกากสับปะรดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำร้อน การสกัดด้วยสารละลายกรด และการสกัดด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อภายใต้หม้ออัดความดันไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที และปล่อยให้เย็น แล้วเปิดสารละลายหัวเชื้อใส่ลงไป 1 มิลลิลิตร และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมงเพื่อนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้

3.6.3 การหาปริมาณเซลล์ยีสต์แห้ง (cell dry weight)

ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง โดยเปิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักเซลล์คงที่

3.6.4 การวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคสที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด

เปิดส่วนใสจากการแยกเซลล์ออกไปแล้ว นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี DNS โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

3.6.5 การสกัดและหาปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อด้วยวิธีของ Bligh and Dyer (1959)

นำเซลล์แห้งของเชื้อมาสกัดน้ำมันโดยการเติมสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล และเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสเก็บไว้ และการกำจัดน้ำโดยเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไป หลังจากนั้นเก็บส่วนบนใสลงในขวดที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน และนำไประเหยตัวทำละลายออกจนหมด และนำไปชั่งหาน้ำหนักของน้ำมัน จะได้ปริมาณของน้ำมันทั้งหมดที่เชื้อผลิตได้

3.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตน้ำมันของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด

3.7.1 การศึกษาผลของปริมาณเริ่มต้นของกากสับปะรดที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อ

นำกากสับปะรดในปริมาณเริ่มต้นร้อยละ 2, 5, 10, 12 และ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปสกัดด้วยสารละลายกรด ภายใต้หม้ออัดความดันไอน้ำ จะได้สารสกัดจากกากสับปะรด ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 6.0 จากนั้นเปิดหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปบ่ม และเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วย จากนั้นเก็บเซลล์เพื่อนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้

3.7.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่างของสารสกัดจากกากสับปะรดที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อ

นำสารสกัดจากกากสับปะรดที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายกรดที่สกัดจากปริมาณกากสับปะรดเริ่มต้นที่เหมาะสม ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 จากนั้นเปิดหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปบ่ม และเขย่าบนเครื่องเขย่าจากนั้นเก็บเซลล์เพื่อนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้

3.7.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อ

นำสารสกัดจากกากสับปะรดที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายกรดที่สกัดจากปริมาณกากสับปะรดเริ่มต้นที่เหมาะสม ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม จากนั้นเปิดหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 28, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส และเขย่าบนเครื่องเขย่า จากนั้นทำการเก็บเซลล์เพื่อนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งและสกัดหาปริมาณน้ำมันต่อไป

3.7.4 การศึกษาผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการเจริญและน้ำมันของเชื้อ

นำสารสกัดจากกากสับประรดที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายกรดที่สกัดจากปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นที่เหมาะสม ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม จากนั้นปิเปตหัวเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม และเขย่าบนเครื่องเขย่า โดยบ่มเป็นระยะเวลานาน 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 และ 140 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์เพื่อนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้

3.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

3.8.1 การวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดและปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันที่ผลิตได้

นำน้ำมันที่สกัดได้ละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและไดเอทิลอีเธอร์ จากนั้นไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1000 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จนถึงจุดยุติได้สารละลายสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ และนำปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปคำนวณหาค่าความเป็นกรด (หน่วย กรัมของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมของน้ำมันที่ใช้) และหาปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมัน (หน่วย เปอร์เซนต์กรดไขมันอิสระ (ในรูป กรดโอริก) โดยน้ำหนัก)

3.8.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบอื่น ๆ ในน้ำมันที่ผลิตได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC)

การวิเคราะห์องค์ประกอบอื่น ๆ ในน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) โดยแซนสารละลายผสมปิโตรเลียมอีเธอร์ : ไดเอทิลอีเธอร์ : กรดอะซิติก ทั้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ผ่านจุดหยดน้ำมันตัวอย่างมาจนถึงขีดสิ้นสุดบนแผ่น TLC แล้วนำแผ่น TLC ไปอังไฟของเกล็ดไอโอไดน์ จะเกิดเป็นแถบของสารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้

3.8.3 การเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในน้ำมันที่ผลิตได้

นำน้ำมันที่สกัดได้ และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ปิดฝาให้สนิทและเขย่านำไปให้ความร้อนโดยแช่หลอดในอ่างน้ำร้อน จากนั้นปล่อยให้เย็น และเติมสารละลาย 14 เปอร์เซนต์ของโบรอนไตรฟลูออไรด์ในเมทานอล ปิดฝาและเขย่านำไปให้ความร้อนอีกครั้ง แล้วปล่อยให้เย็น ปิเปตเฮกเซนลงไปและเขย่าอย่างรุนแรง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัวและเขย่าให้เข้ากัน และกำจัดน้ำออกด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส และสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยเฮกเซน จะได้เมธิลเอสเทอร์ของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส

3.8.4 การวิเคราะห์หาเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ผลิตได้

นำเมธิลเอสเทอร์ที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย เครื่อง GC – 17A gas chromatography (Shimadzu) โดยสภาวะสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC โดยมีเครื่องตรวจจับ (detector) เป็น Flame ionization detector (FID) และแยกด้วยคอลัมน์ชนิด BP-20 โดยอุณหภูมิของ injector เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ detector 300 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของคอลัมน์ เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส และเพิ่มขึ้นทุก 6 องศาเซลเซียสต่อนาที จนอุณหภูมิสุดท้ายเป็น 260 องศาเซลเซียส โดยมีไนโตรเจนเป็นตัวพา โดยใช้ปริมาณของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหาชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบโดยเทียบค่าเวลาริเทนชันและหาปริมาณของกรดไขมันโดยคำนวณจากเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐาน

3.9 การหาเทคนิคและวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ที่คัดเลือกแล้วให้มากที่สุด

3.9.1. การสกัดน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

3.9.1.1 การสกัดน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วตามวิธีของ Bligh และ

Dyer (1959)

นำเซลล์แห้งของยีสต์ ประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วสกัดโดยการเติมสารผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และแยกชั้นล่างซึ่งเป็นสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและน้ำมันเก็บไว้ ส่วนชั้นบนซึ่งเป็นส่วนของเซลล์ให้นำมาสกัดซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนของคลอโรฟอร์มมารวมกันและนำไประเหยคลอโรฟอร์มออกภายใต้สุญญากาศ จะได้ส่วนของน้ำมัน จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก จนได้น้ำหนักคงที่ จะได้น้ำหนักของน้ำมันที่สกัดได้ (กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)

3.9.1.2 การสกัดน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วตามวิธีของ Roese-Gottlieb

(1959)

นำเซลล์แห้งของยีสต์ ประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำต้มเดือด 6 มิลลิลิตรเขย่า 5 นาที ทำให้เย็น จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 นาทีและเติมไดเอธิลอีเทอร์ปริมาตร 17 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง และสุดท้ายเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 17 มิลลิลิตรแล้วเขย่านำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะเกิดการแยกชั้นโดยชั้นบนเป็นชั้นที่มีน้ำมันอยู่ นำส่วนกากเซลล์ที่เหลือสกัดซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นแยกส่วนชั้นบนออก และนำไประเหยตัวทำละลายออก นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ (กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)

3.9.2 การทำให้เซลล์แตกและการสกัดน้ำมันจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

3.9.2.1 การทำให้เซลล์แตกและการสกัดน้ำมันจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วด้วยคลื่นเสียง

ความถี่สูง (sonication)

นำเซลล์แห้งของยีสต์ ประมาณ 0.05 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง ด้วยความถี่ของคลื่นเสียง 500 วัตต์ โดยการทำงาน เวลาคลื่นเสียงทำงาน 3 วินาที และคลื่นเสียงหยุดทำงาน 3 วินาที ประมาณ 90 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ที่ผ่านการทำให้แตกแล้วนำไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer จากนั้นนำส่วนของคลอโรฟอร์มที่มีน้ำมันผสมอยู่ไประเหยคลอโรฟอร์มออกภายใต้สุญญากาศ นำไปชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่เพื่อหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ (กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)

3.9.2.2 การทำให้เซลล์แตกและการสกัดน้ำมันจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วโดยการบดด้วย

เม็ดบีด (bead)

ซึ่งเซลล์แห้งของยีสต์ ประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในโถรง เติมเม็ดบีดลงไปแล้วบดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกเซลล์ที่แตกแล้วและเม็ดบีดออกจากกัน โดยการเติมเมทานอลลงไปเพื่อชะเซลล์ที่แตกออกจากเม็ดบีด จากนั้นสกัดน้ำมันโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer แล้วนำส่วนของส่วนผสมระหว่างคลอโรฟอร์มมารวมกันและนำไประเหยคลอโรฟอร์มออกภายใต้สุญญากาศ และนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ (กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)

3.9.2.3 การทำให้เซลล์แตกและการสกัดน้ำมันจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วภายใต้สภาวะหม้อหึ่งความดัน (autoclaving)

นำเซลล์แห้งของยีสต์ ประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าหม้อหึ่งความดันโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็น และนำมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer นำส่วนของคลอโรฟอร์มที่มีน้ำมันผสมอยู่ไประเหยคลอโรฟอร์มออกภายใต้ความดันสุญญากาศ แล้วนำน้ำมันที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ (กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)

3.9.2.4 การทำให้เซลล์แตกและการสกัดน้ำมันจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave)

นำเซลล์แห้งของยีสต์ ประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องไมโครเวฟ ความถี่ 2450 เมกะเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้เย็น และสกัดน้ำมันโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer จากนั้นนำส่วนของผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและน้ำมันไประเหยคลอโรฟอร์มออกภายใต้สุญญากาศ และนำน้ำมันที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ (กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)

3.10 การเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

3.10.1 การเตรียมไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบ 1 ขั้นตอน (one-step alkali transesterification)

3.10.1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการเกิดปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

นำน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วมาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยนำโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมัน 0.5 1 1.5 2 2.5 และ 3 โดยน้ำหนัก และจากนั้นเติมเมทานอลเป็นอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก และนำส่วนผสมไปต้มให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเทส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างกลีเซอรอลกับไบโอดีเซลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยชั้นบนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซล และส่วนชั้นล่างเป็นกลีเซอรอล จากนั้นแยกกลีเซอรอลออกแล้วจึงนำไบโอดีเซลที่ผลิตได้มาผ่านกระบวนการล้างด้วยน้ำ จะได้ไบโอดีเซลและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซลที่ได้

3.10.1.2 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่ผลิตได้ต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 1 ขั้นตอนที่มีเบสเป็นตัวเร่ง

นำน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วมาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยนำโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นที่เหมาะสม และจากนั้นเติมเมทานอลในอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 15 20 30 40 50 60 70 และ 80 โดยน้ำหนัก และนำส่วนผสมไปต้มให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเทส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างกลีเซอรอลกับไบโอดีเซลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยชั้นบนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน หรือไบโอดีเซล และส่วนชั้นล่างเป็นกลีเซอรอล จากนั้นแยกกลีเซอรอลออก แล้วจึงนำไบโอดีเซลที่ผลิตได้มาผ่าน

กระบวนการล้างด้วยน้ำ จะได้ไบโอดีเซลและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซลที่ได้

3.10.2 การเตรียมไบโอดีเซลโดยกระบวนการ 2 ขั้นตอนโดยใช้กรดและเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (two-step acid-base catalyzed transesterification)

3.10.2.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยการเร่งด้วยกรดขั้นตอนที่ 1 (acid esterification)

1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกต่อการเกิดปฏิกิริยา

นำน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว เติมกรดซัลฟิวริกโดยมีความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ ร้อยละ 0.25 0.5 0.75 1 1.5 และ 2 โดยปริมาตรต่อน้ำมัน 1 ลิตร และให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 50 โดยน้ำหนักและเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเทส่วนผสมทั้งหมดลงในกรวยแยก และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นโดยชั้นเมทานอลและสิ่งเจือปนอื่นอยู่ชั้นบนต้องกำจัดทิ้ง ส่วนชั้นล่างเป็นส่วนของน้ำมันที่มีค่าความเป็นกรดลดลง จากนั้นหาค่าความเป็นกรดและปริมาณของกรดไขมันอิสระ

2 การศึกษาผลของปริมาณเมทานอลต่อการเกิดปฏิกิริยา

นำน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว เติมกรดซัลฟิวริกโดยมีความเข้มข้นที่เหมาะสม และให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเมทานอลโดยปริมาณเมทานอลที่เติมมีความแตกต่างกันโดยเทียบอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 10 15 20 25 30 40 50 60 และ 70 โดยน้ำหนัก และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเทส่วนผสมทั้งหมดลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นโดยชั้นเมทานอลและสิ่งเจือปนอื่นอยู่ชั้นบนและต้องกำจัดทิ้ง ส่วนชั้นล่างเป็นส่วนของน้ำมันที่มีค่าความเป็นกรดลดลง จากนั้นหาค่าความเป็นกรดและปริมาณของกรดไขมันอิสระ

3.10.2.2 ปฏิกิริยาการเตรียมไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งขั้นตอนที่ 2 (base catalyzed transesterification)

1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการเร่งปฏิกิริยา

นำน้ำมันที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอลต่อน้ำมันโดยมีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือร้อยละ 0.5 1 1.5 2 2.5 3 และ 3.5 โดยน้ำหนัก และให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทผสมลงไปน้ำมัน จากนั้นให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้เกิดการแยกชั้น 24 ชั่วโมง จะได้ชั้นบนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ส่วนชั้นล่างกลีเซอรอล จากนั้นแยกส่วนเมทิลเอสเทอร์ออก.....กรดไขมัน และล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดเมทานอลที่เหลือออกไป แล้วนำไปวัดวิเคราะห์หาปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้

2 การศึกษาผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

นำน้ำมันที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมโดยละลายในปริมาณของเมทานอลที่ต่างกัน โดยได้ศึกษาปริมาณของเมทานอลที่ใช้โดยเทียบเป็นอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 10 20 30 40 50 และ 60 โดยน้ำหนักและให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทผสมลงไปน้ำมัน จากนั้นให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้เกิดการแยกชั้น 24 ชั่วโมง จะได้ชั้นบนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ส่วนชั้นล่างเป็นกลี

เซอร์คอล จากนั้นแยกส่วนเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน และล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดเมทานอลที่เหลือออกไป แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ต่อไป

3.10.2.3 ปฏิกริยาการเตรียมไบโอดีเซลโดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง (lipase catalyzed transesterification)

1 การศึกษาผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส

นำน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว เติมเอนไซม์ไลเปสโดยมีความเข้มข้นร้อยละ 20 ของน้ำหนักน้ำมัน และเติมน้ำร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของน้ำมัน จากนั้นเติมเมทานอลโดยปริมาณของเมทานอลเทียบเป็นอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่ใช้ ร้อยละ 10 20 30 40 50 และ 60 โดยน้ำหนัก และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบทั้งหมดลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นโดยชั้นบนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ส่วนชั้นล่างเป็นส่วนของกลีเซอรอล จากนั้นแยกชั้นเมทิลเอสเทอร์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป

2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส

นำน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว เติมเอนไซม์ไลเปสโดยมีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักของน้ำมัน และเติมน้ำร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของน้ำมัน จากนั้นเติมเมทานอลในอัตราส่วนที่เหมาะสม และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบทั้งหมดลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นโดยชั้นบนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ส่วนชั้นล่างเป็นส่วนของกลีเซอรอล จากนั้นแยกชั้นเมทิลเอสเทอร์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป

2 การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส

นำน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว เติมเอนไซม์ไลเปสโดยมีความเข้มข้นร้อยละ 20 ของน้ำหนักน้ำมัน และเติมน้ำปริมาณ 0 0.1 0.5 1 และ 2 กรัมต่อน้ำหนักของน้ำมัน จากนั้นเติมเมทานอลในอัตราส่วนที่เหมาะสม และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบทั้งหมดลงในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นโดยชั้นบนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ส่วนชั้นล่างเป็นส่วนของกลีเซอรอล จากนั้นแยกชั้นเมทิลเอสเทอร์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป

3.11 การผลิตน้ำมันจากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดร้อยละ 15 โดยการย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.2 นอร์มอล และปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 6.0 ปริมาตร 3.5 ลิตรใส่ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร เติมหัวเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วลงไปร้อยละ 10 จากนั้นกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และให้อากาศด้วยอัตราการให้อากาศ 0.6 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ปรับอุณหภูมิให้คงที่เท่ากับ 28 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อเพื่อหาน้ำมันเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) สกัดและหาปริมาณน้ำมันที่เชื่อผลผลิตได้ (กรัมต่อลิตร กรัมต่อกรัมเซลล์ และคิดเป็นร้อยละ โดยน้ำหนัก)

บทที่ 4

ผลงานวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตไขมัน

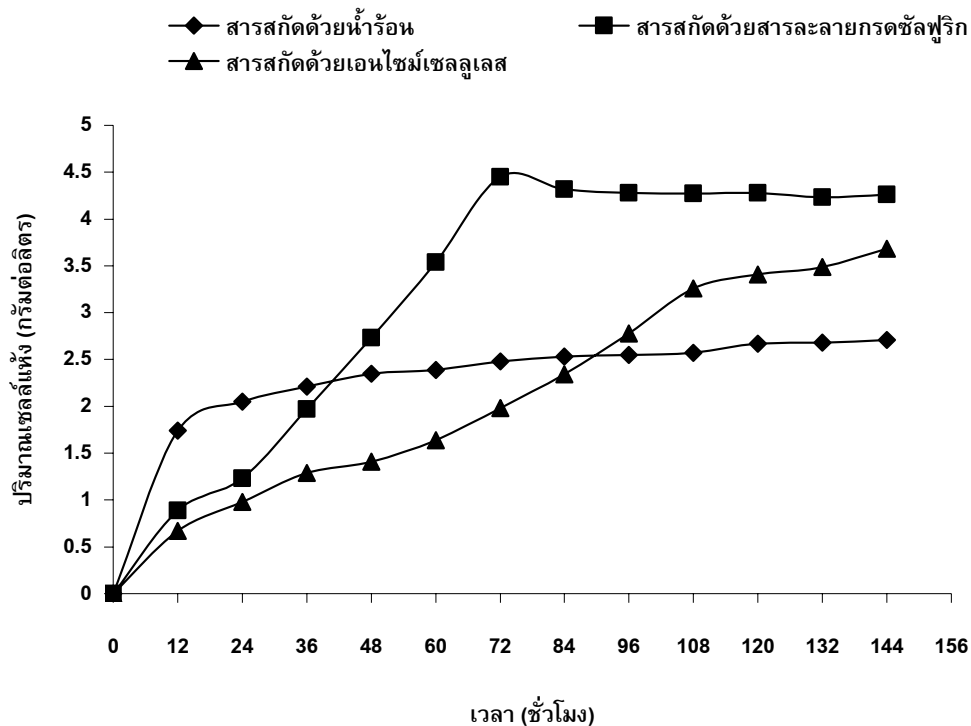
ในการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตไขมัน ได้ศึกษาวิธีการในการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรด 3 วิธี คือ การเตรียมสารสกัดด้วยการสกัดด้วยน้ำร้อน การย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก และการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากนั้นนำสารสกัดจากกากสับปะรดที่ได้ไปหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด และหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด พบว่าการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดโดยการสกัดด้วยน้ำร้อน พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในสารสกัดจากกากสับปะรดมีค่าเท่ากับ 2.50 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 0.14 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าสารสกัดจากกากสับปะรดที่สกัดได้มีลักษณะเป็นของเหลวใสและมีสีเหลืองอ่อน และในการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดโดยการสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกภายใต้สภาวะหม้อนึ่งอัดความดัน พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดเท่ากับ 27.68 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตร และสารสกัดที่สกัดได้จากการย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก มีลักษณะใสและมีสีน้ำตาลอ่อน สำหรับการสกัดจากสับปะรดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าลักษณะของสารสกัดที่เตรียมมีสีเหลืองอ่อนใส และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดพบว่ามีค่าเท่ากับ 6.23 และ 0.24 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้จาก 3 วิธี พบว่าสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้นั้นมีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เชื้อยีสต์สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ถือว่าเป็นแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญในการที่เชื้อจะนำไปใช้ในการสร้างเป็นส่วนประกอบของเซลล์ และยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการผลิตไขมันอีกด้วย และถึงแม้ว่าปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดในสารสกัดจากกากสับปะรดมีปริมาณน้อย ยังถือว่าเพียงพอที่เชื้อสามารถนำไปใช้สร้างเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้เนื่องจากการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์ สามารถผลิตไขมันได้ดีเมื่อค่าสัดส่วนของปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนมีค่าสูง ซึ่งสอดคล้องกับค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้ โดยจะได้ว่าค่าสัดส่วนของปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้จากการสกัดด้วยสารละลายกรดมีค่ามากที่สุดประมาณ 185 เท่า รองลงมาคือสารสกัดจากกากสับปะรดที่สกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (26 เท่า) และสารสกัดจากน้ำร้อน (18 เท่า)

4.2 ความเป็นไปได้ในการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อการเจริญ และการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

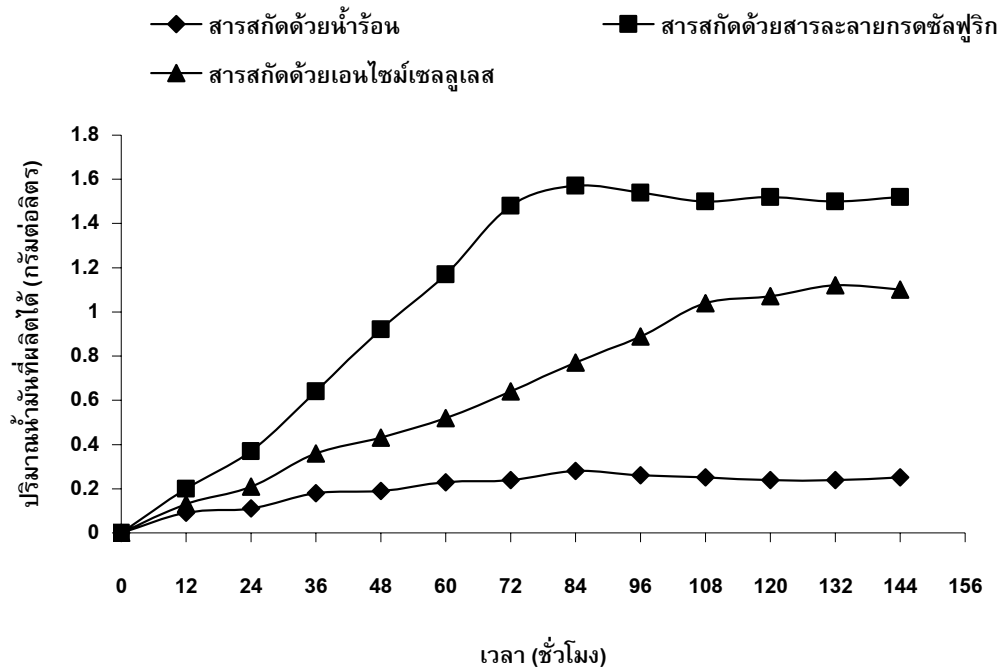
ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากกากสับปะรดมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยศึกษาการเจริญและการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด พบว่า การเจริญของเชื้อในสารสกัดจากกากสับปะรดในรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อเริ่มถ่ายเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และหลังจากนั้นพบว่าเชื้อยังคงมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างต่อเนื่อง และหลังจากนั้นเชื้อมีการเจริญค่อนข้างคงที่ โดยพบว่าเชื้อสามารถเจริญในสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมโดยการสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก โดยพบมีน้ำหนักเซลล์มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็น

เวลา 84 ชั่วโมงและมีค่าเท่ากับ 1.57 กรัมต่อลิตรของสารสกัดจากการสับปะรด และการเจริญของเชื้อในสารสกัดจากสับปะรดที่สกัดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าปริมาณเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ 1.12 กรัมต่อลิตรของสารสกัดจากสับปะรด เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 144 ชั่วโมง และการเจริญของเชื้อในสารสกัดจากสับปะรดที่สกัดด้วยน้ำร้อนพบว่าเชื้อมีการเจริญได้น้อยกว่า โดยพบมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.28 กรัมต่อลิตรของสารสกัดจากสับปะรด

สำหรับการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากสับปะรด พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสารสกัดจากสับปะรด เชื้อยีสต์มีการผลิตน้ำมันได้เล็กน้อยในช่วงแรกของการเจริญเติบโต และการผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงระยะการเจริญแบบทวีคูณและการผลิตน้ำมันเริ่มคงที่เมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และพบว่าความสามารถในการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากสับปะรดที่เตรียมได้จากการสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเกิดขึ้นได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยพบว่าในสารสกัดจากสับปะรดที่สกัดด้วยสารละลายกรดพบว่า เชื้อสามารถผลิตน้ำได้มากที่สุดเมื่อบ่มนาน 84 ชั่วโมง และปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 1.57 กรัมต่อลิตร เมื่อคิดเป็นผลผลิตน้ำมันที่ผลิตได้เทียบกับเซลล์แห้งพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.36 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และเมื่อเทียบการผลิตน้ำมันในสารสกัดจากสับปะรดที่สกัดด้วยน้ำร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.28 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็นผลผลิตน้ำมันที่ผลิตได้เทียบกับเซลล์แห้งพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.11 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และมีค่าเท่ากับ 1.12 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็นผลผลิตน้ำมันที่ผลิตได้เทียบกับเซลล์แห้งพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.30 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับจากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากสับปะรด พบว่า เชื้อยีสต์สามารถผลิตน้ำมันได้เมื่อเลี้ยงในสารสกัดจากสับปะรด แสดงว่า เชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากสารสกัดจากสับปะรดเพื่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อได้ และในการผลิตน้ำมันของเชื้อจะสามารถผลิตได้มากที่สุดเมื่อได้มีการปรับให้สภาวะแวดล้อมให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันให้ได้มากที่สุด ดังนั้นจึงต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากสับปะรด



รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากสับปะรดที่เตรียมได้



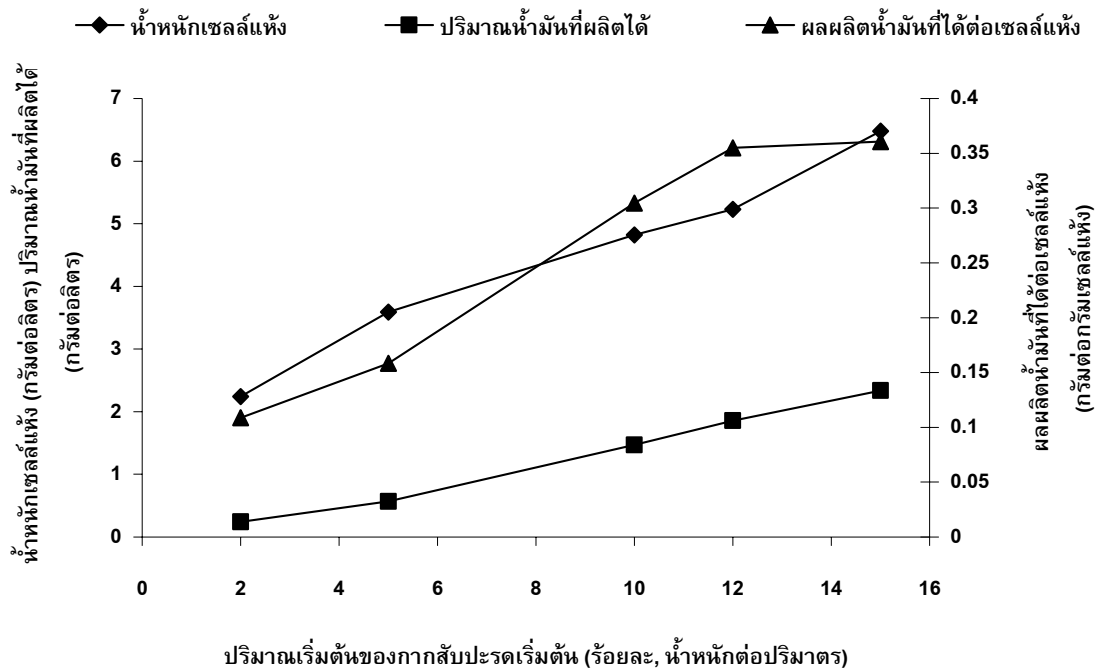
รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับประรด

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อในสารสกัดจากกากสับประรด

4.3.1 ผลของปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นในการเตรียมเป็นสารสกัดจากกากสับประรดที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

จากการเตรียมสารสกัดจากกากสับประรดเมื่อใช้ปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นที่ต่างกันและสกัดภายใต้หม้อนึ่งอัดไอน้ำ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นของสารสกัดให้มากขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะมีค่ามากขึ้น และปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 46.41 กรัมต่อลิตรสารสกัดจากกากสับประรด และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับประรดที่มีปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 84 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหาค่าหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำมันและผลผลิตน้ำมันที่ผลิตได้ และวิเคราะห์ประมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.3

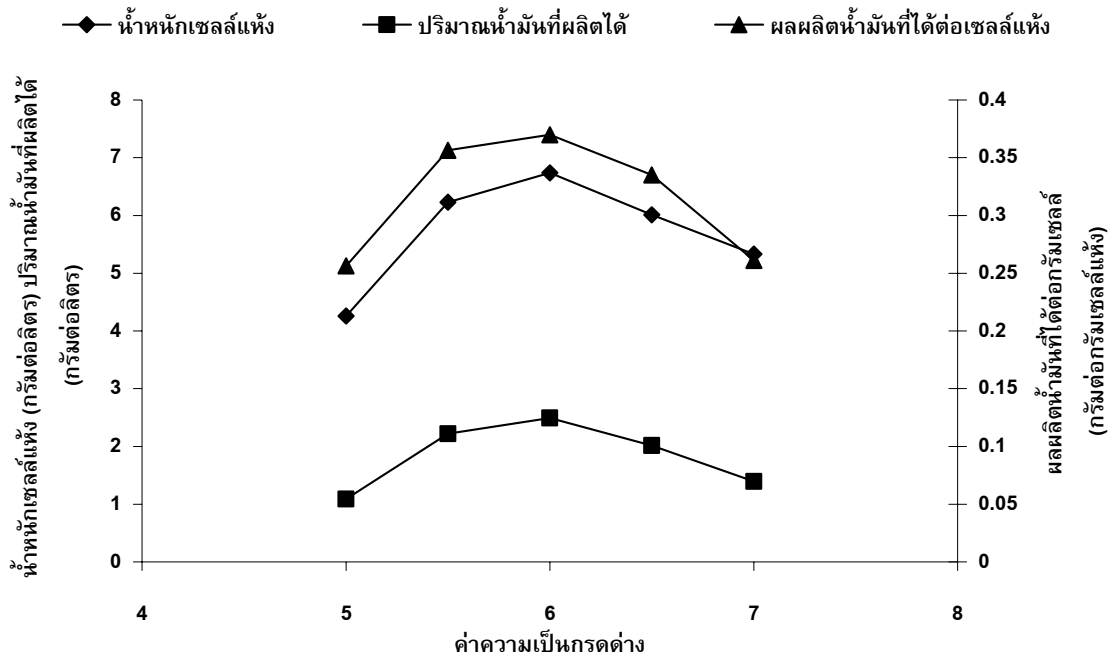
จากรูปที่ 4.3 จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ของเชื้อยีสต์เมื่อใช้ปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นของสารสกัดจากกากสับประรดต่างกัน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้มีค่าแตกต่างกัน โดยน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อมีปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นของสารสกัดจากกากสับประรดเพิ่มขึ้น โดยพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันมีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสารสกัดจากกากสับประรดที่มีปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมีค่าเท่ากับ 6.48 กรัมต่อลิตร และ 2.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในสารสกัดจากกากสับประรดที่มีปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นแตกต่างกัน ทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์แตกต่างกัน โดยพบว่าในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับประรดที่มีปริมาณกากสับประรดเริ่มต้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ทำให้เชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันได้มากที่สุดด้วย



รูปที่ 4.3 การเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับประดเมื่อใช้ปริมาณกากสับประดเริ่มต้นต่างกัน

4.3.2 ผลของค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับประดที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์

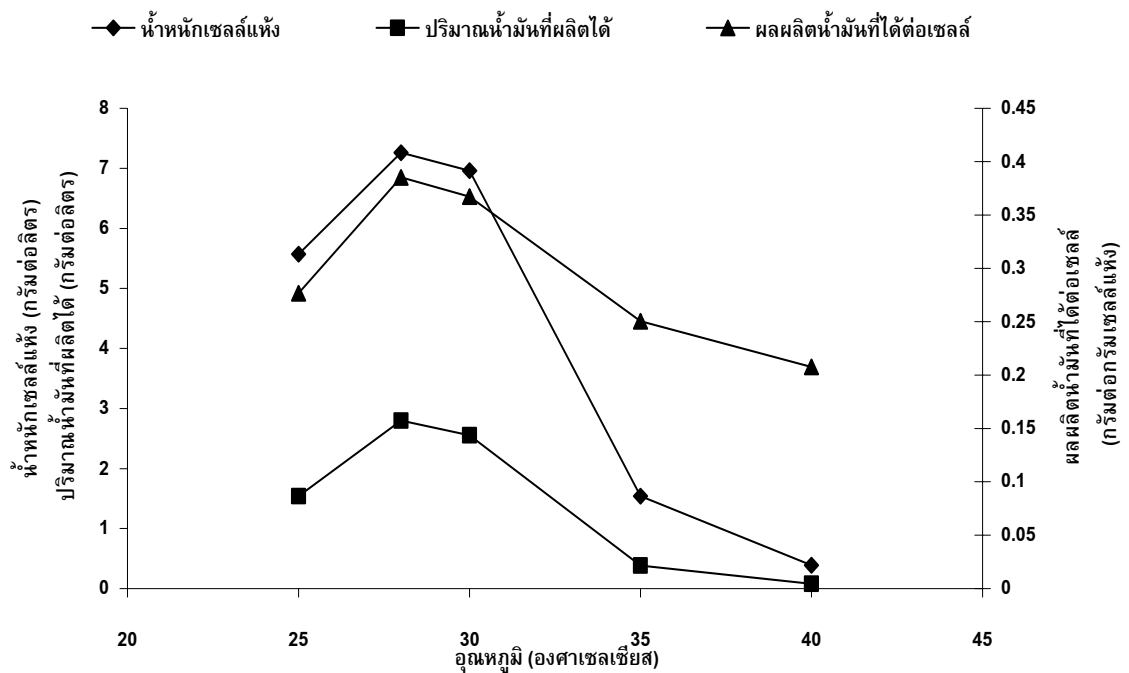
ในการศึกษาความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของสารสกัดจากกากสับประดที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับประดที่มีปริมาณกากสับประดเริ่มต้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.4 แสดงการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับประด พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของสารสกัดจากกากสับประดอยู่ที่ 6.0 โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 6.74 กรัมต่อลิตร และในการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์พบว่าปริมาณน้ำมันจะถูกผลิตออกมามากเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของสารสกัดจากกากสับประดอยู่ในช่วง 5.5 - 6.0 โดยพบว่าปริมาณน้ำมันจะมีค่ามากที่สุดเมื่อมีค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของกากสับประดเท่ากับ 6.0 และให้ค่าปริมาณน้ำมันเท่ากับ 2.49 กรัมต่อลิตร และเมื่อเทียบผลผลิตน้ำมันที่ได้ต่อเซลล์แห้งพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.37 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และเมื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของสารสกัดจากกากสับประดให้มีค่ามากกว่า 6.0 พบว่าเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะค่าความเป็นด่างสูงไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์



รูปที่ 4.4 ผลของค่าความเป็นกรดต่างต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันจากเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรด

4.3.3 ผลของอุณหภูมิในการบ่มที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด

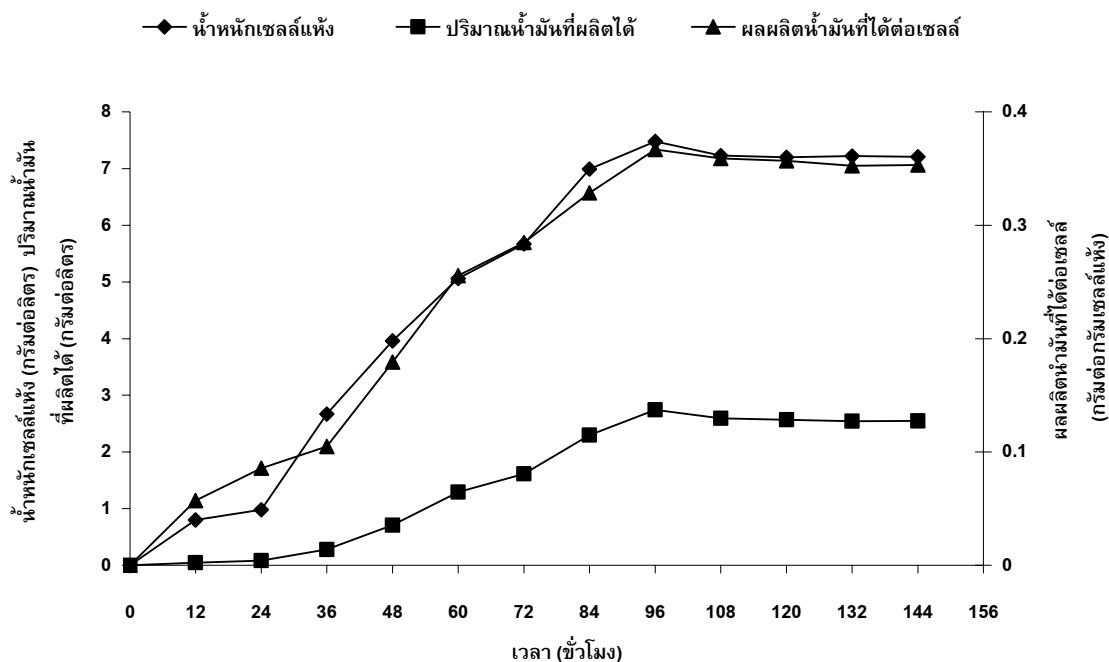
ในการศึกษาผลของอุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรดที่มีปริมาณกากสับปะรดเริ่มต้นของสารสกัดจากกากสับปะรดร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 และบ่มเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.5 จะได้ว่าการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรดที่มีปริมาณกากสับปะรดเริ่มต้นร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 โดยมีการแปรผันอุณหภูมิในการบ่ม พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มของเชื้อยีสต์ คืออุณหภูมิช่วง 28 ถึง 30 องศาเซลเซียส และเชื้อจะมีการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันได้มากที่สุดที่อุณหภูมิในการบ่ม 28 องศาเซลเซียส จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 7.26 กรัมต่อลิตร และ 2.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำมันจะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มมากกว่า 30 องศาเซลเซียสคือในช่วงอุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันได้น้อย โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันได้น้อยที่สุดเนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่สูงเกินไปไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ



รูปที่ 4.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันจากเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรด

4.3.4 ผลของเวลาในการบ่มที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด

จากรูปที่ 4.6 แสดงการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรด ในการเจริญของเชื้อพบว่าในช่วงแรก (0-24 ชั่วโมง) เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ และหลังจากนั้นพบว่าเชื้อยังคงมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมง 96 โดยพบมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมีค่าเท่ากับ 7.48 กรัมต่อลิตรสารสกัดจากกากสับปะรด สำหรับการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรด พบว่าในช่วงแรกของการเจริญของเชื้อ เชื้อมีการผลิตน้ำมันได้ในปริมาณที่น้อยเนื่องจากการผลิตน้ำมันเพื่อเป็นองค์ประกอบของเซลล์ และเมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้นพบว่าเชื้อมีการผลิตน้ำมันได้มากขึ้นเรื่อย ๆ อย่างต่อเนื่องและพบว่าเชื้อสามารถผลิตน้ำมันได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง โดยพบเชื้อยีสต์สามารถผลิตน้ำมันมีค่าเท่ากับ 2.74 กรัมต่อลิตร และเมื่อเทียบผลิตน้ำมันที่ได้ต่อเซลล์แห้ง พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.37 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง



รูปที่ 4.6 ผลของเวลาต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรด

4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

4.4.1 การวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดและปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันที่ผลิตได้

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันที่สกัดจากเชื้อยีสต์โดยการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยมีฟีนอล์ฟทาเลอินเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้กรดไขมันอิสระสูงถึงร้อยละ 22.7 และมีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 63.93 มิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมันและเมื่อเทียบกับกรดไขมันอิสระที่ได้จากน้ำมันปาล์ม พบว่าน้ำมันปาล์มมีค่ากรดไขมันอิสระร้อยละ 0.9 และมีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 1.58 มิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

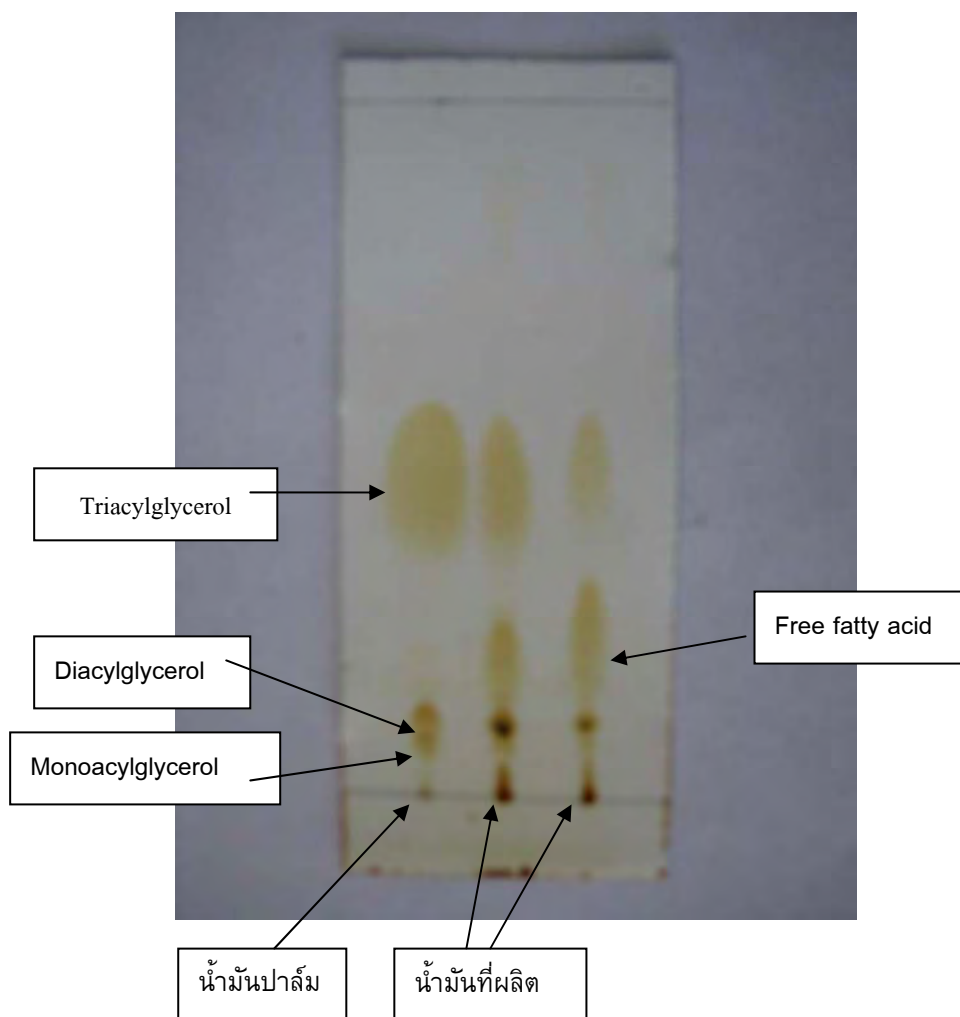
ตารางที่ 4.1 ค่าความเป็นกรดและปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

ตัวอย่าง	ค่าความเป็นกรด	ปริมาณกรดไขมันอิสระ (ร้อยละ)
น้ำมันปาล์ม	1.58	0.9
น้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์	63.93	22.7

4.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบางพบว่าองค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ประกอบด้วย ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) และเมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มพบว่าในน้ำมันปาล์มมีปริมาณของไตรเอซิลกลีเซอรอลมากกว่า

น้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ ส่วนในน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์พบโมโนเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระในปริมาณสูง ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์เทียบกับน้ำมันปาล์ม

4.4.3 การเตรียมและวิเคราะห์หาเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊สและแมสสเปกโทเมตรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)

จากการวิเคราะห์เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊สและแมสสเปกโทเมตรี โดยเทียบกับเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐาน โดยผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และโครมาโทแกรมของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันแสดงในรูปที่ 4.8 จากนั้นคำนวณหาปริมาณของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันแต่ละชนิดโดยเมื่อเทียบพื้นที่ใต้กราฟของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐาน จะเห็นได้ว่าเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้ พบปริมาณของเมธิลเอสเทอร์ของกรดโอเลอิกมากที่สุด โดยพบมีค่า 558.17 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมันที่ผลิตได้คิดเป็นร้อยละ 54.41 ของเมธิล-เอสเทอร์ของกรดไขมันทั้งหมด และเมื่อเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่ามีความเท่ากับ 82.15 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และเมธิลเอสเทอร์ของ

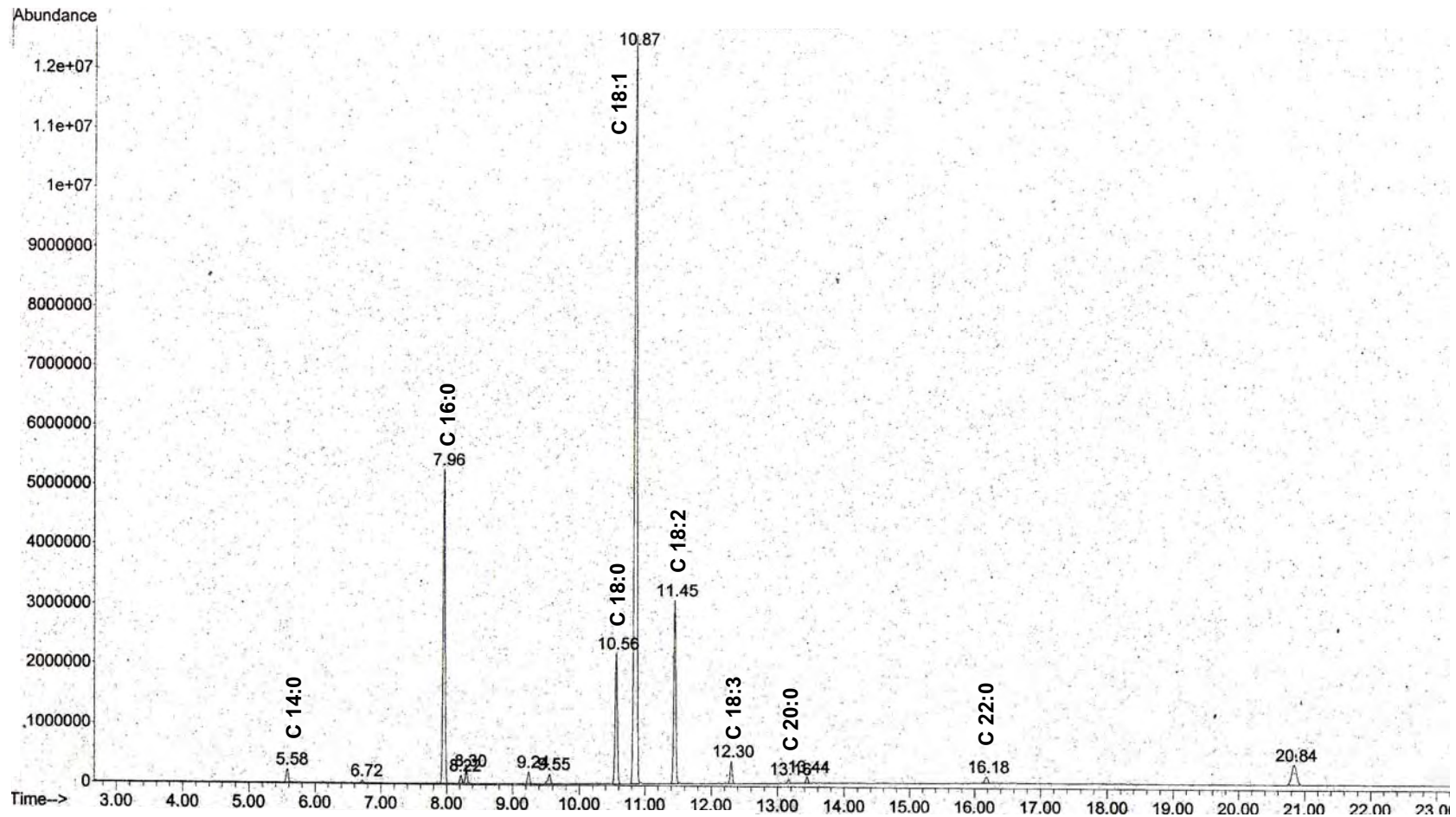
กรดไขมันที่พบรองลงมาคือ เมธิล เอสเทอร์ของกรดปาล์มิติก โดยพบมีปริมาณเท่ากับ 165.76 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน คิดเป็นร้อยละ 18.17 ของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันทั้งหมด และพบว่ามีปริมาณ 24.40 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังพบเมธิลเอสเทอร์ของกรดลิโนเลอิก โดยพบมากเป็นอันดับสามคือ คิดเป็นร้อยละ 10.77 ของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันทั้งหมดโดยมีปริมาณเท่ากับ 119.37 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และมีปริมาณต่อกรัมเซลล์เท่ากับ 17.57 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และยังพบเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันชนิดอื่นด้วย คิดรวมเป็นร้อยละ 5.78 ของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันทั้งหมดในน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

ตารางที่ 4.2 แสดงเวลารีเทนชัน และปริมาณเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่สกัดจากยีสต์

Fatty acid Methyl ester	Retention time	% total	FAME* (mg/g oil)	FAME (mg/g cell)
Mryistic acid methyl ester	5.578	0.85	7.28	1.07
Pentadecanoic acid methyl ester	6.717	0.15	-	-
Palmitic acid methyl ester	7.957	18.17	165.76	24.40
7-Hexadecenoic acid methyl ester	8.217	0.43	-	-
Pamitoleic acid methyl ester	8.304	0.69	-	-
Heptadecanoic acid methyl ester	9.242	0.67	-	-
Cyclopropaneoctanoic acid methyl ester	9.555	0.70	-	-
Stearic acid methyl ester	10.564	7.93	78.30	11.52
Oleic acid methyl ester	10.872	54.41	558.17	82.15
Linoleic acid methyl ester	11.455	10.77	119.37	17.57
Linolenic acid methyl ester	12.302	1.27	14.59	2.15
Arachidic acid methyl ester	13.165	0.24	2.47	0.36
11-Eicosenoic acid methyl ester	13.440	0.37	-	-
Behenic acid methyl ester	16.181	0.58	5.81	0.86
Tetracosanoic acid methyl ester	20.843	2.78	-	-

*** FAME - Fatty acid methyl ester**

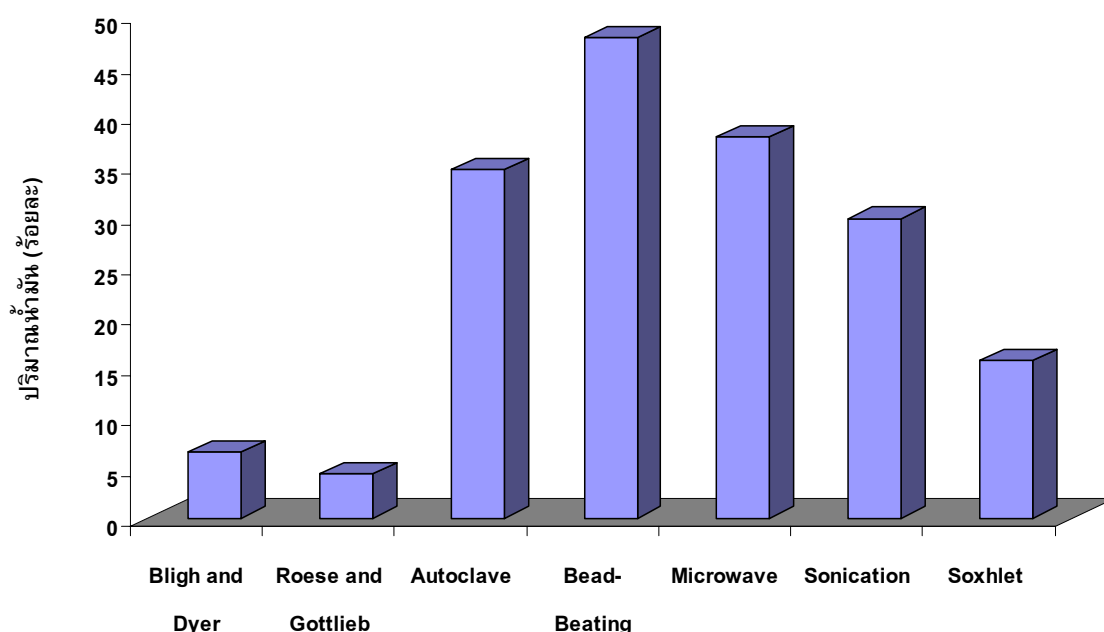
จากการศึกษาการผลิตน้ำมันจากยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรดและได้วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้ พบว่าประกอบด้วยกรดโอเลอิกมากที่สุด ซึ่งคล้ายคลึงกับน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ผลิตไขมันสูงชนิดอื่น และเมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบหลักของน้ำมันที่ผลิตได้กับน้ำมันพืชและไขมันจากสัตว์ที่นำมาเตรียมเป็นไบโอดีเซลพบว่าองค์ประกอบของน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันสนุดำ และไขมันจากสัตว์พบว่ามีกรดปาล์มิติก กรดโอเลอิก และกรดลิโนเลอิกเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นจะได้ว่าองค์ประกอบของน้ำมันจากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว มีองค์ประกอบที่คล้ายกับน้ำมันที่นำมาเตรียมเป็นไบโอดีเซลในทางอุตสาหกรรม ดังนั้นสามารถนำน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วสามารถเตรียมเป็นไบโอดีเซลได้ ซึ่งต้องศึกษาวิธีการเตรียมเป็นไบโอดีเซลและศึกษาคุณภาพของไบโอดีเซลที่เตรียมได้ต่อไป



รูปที่ 4.8 แสดงโครมาโทแกรมของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด โดยประกอบด้วยเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันดังนี้ C14:0 (Myristic acid) C16:0 (Palmitic acid) C18:0 (stearic acid) C18:1 (Oleic acid) C18:2 (Linoleic acid) C18:3 (Linolenic acid) C20:0 (Arachidic acid) C22:0 (Behenic acid)

4.5 ผลการเปรียบเทียบเทคนิคและวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ผลิตน้ำมันปริมาณสูงที่คัดเลือกแล้ว

จากการศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ที่ผลิตน้ำมันในปริมาณสูงที่คัดเลือกแล้ว โดยได้เลือกใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ ได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลายตามวิธีของ Bligh และ Dyer ตามวิธีของ Roese และ Gottlieb การสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์โดยใช้เครื่องชอกห์เลต และการทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave) คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) การใช้ความร้อนขึ้นภายใต้ความดันสูง (autoclave) และการบดด้วยเมตบีท (beat-beating) และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer พบว่าได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำมันจากเซลล์ยีสต์ผลิตน้ำมันในปริมาณสูงที่คัดเลือกแล้ว

จากรูปที่ 4.9 พบว่าเทคนิคต่าง ๆ ที่เลือกใช้เพื่อสกัดน้ำมันออกจากเซลล์และการทำให้เซลล์แตก จะมีผลต่อการสกัดน้ำมันและการทำให้เซลล์แตกที่แตกต่างกัน โดยพบว่าการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer และตามวิธีของ Roese และ Gottlieb พบว่าการสกัดตามวิธีของ Bligh และ Dyer สามารถสกัดน้ำมันได้มากกว่า และพบปริมาณน้ำมันที่สกัดได้มีค่าเท่ากับร้อยละ 6.5 ส่วนการสกัดตามวิธีของ Roese และ Gottlieb พบปริมาณที่สกัดได้มีค่าเท่ากับร้อยละ 4.4 จากนั้นศึกษาเทคนิคการทำให้เซลล์แตกก่อนแล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย เพื่อสามารถสกัดแยกน้ำมันออกจากเซลล์ให้ได้มากที่สุด จากการทดลองพบว่าการทำให้เซลล์แตกด้วยการบดด้วยเมตบีทและสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer จะได้ปริมาณของน้ำมันที่สกัดได้มากที่สุด โดยพบคิดเป็นร้อยละ 47.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งพบว่ามีปริมาณน้ำมันที่ได้มีปริมาณมากขึ้นเมื่อเทียบการสกัดด้วยตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 7.3 เท่า และรองลงมาเป็นการทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟ และ การใช้ความร้อนขึ้นภายใต้ความดันสูงภายในหม้อนึ่งอัดความดัน พบว่าได้ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ คิดเป็นร้อยละ 37.9 และ 34.7 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ศึกษาการทำให้เซลล์

แต่กด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง พบว่าสามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้ร้อยละ 29.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากการสกัดน้ำมันโดยใช้เครื่องซอกส์เลตและปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลายในการสกัด พบว่าสามารถสกัดน้ำมันได้ร้อยละ 15.7 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

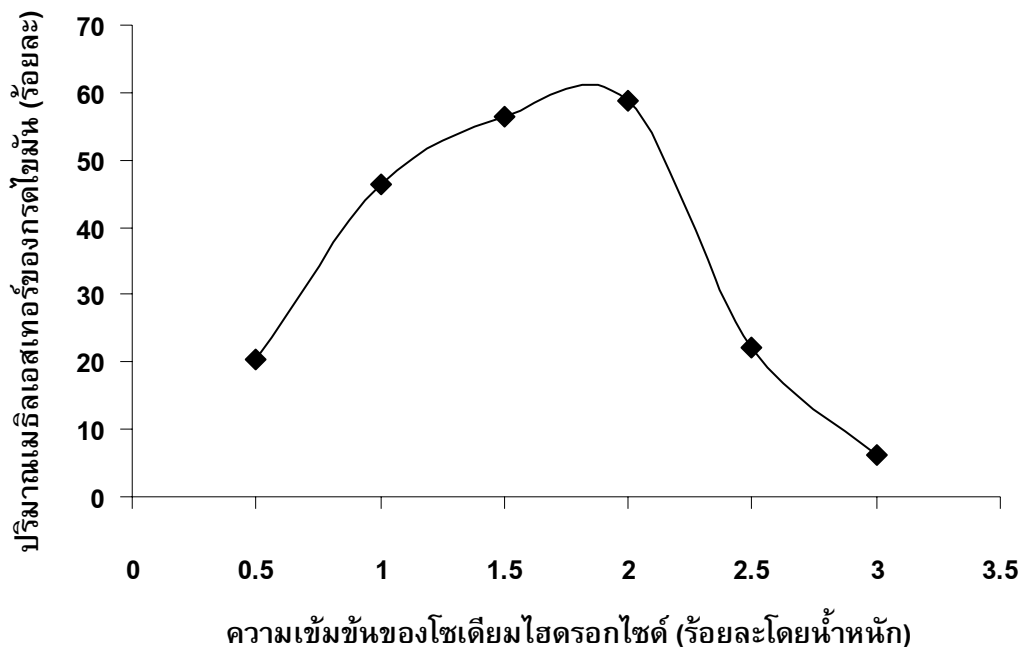
4.6 การเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ผลิตน้ำมันปริมาณสูงที่คัดเลือกแล้วโดยผ่านการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

4.6.1 การเตรียมไบโอดีเซลผ่านการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 1 ขั้นตอนโดยมีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (one-step alkali base transesterification)

ในการเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วด้วยการใช้สารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนน้ำมันที่ผลิตได้เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซล ได้แก่ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา และอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่เหมาะสม โดยบ่มให้เกิดปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซล แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้

4.6.1.1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นตัวเร่งที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันพบว่าได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.10

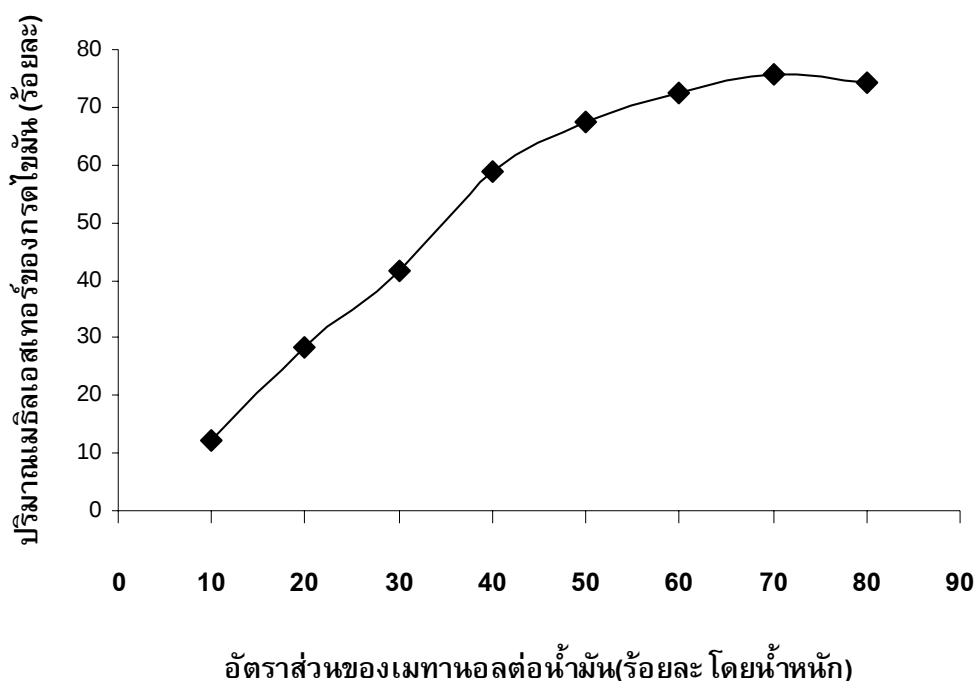


รูปที่ 4.10 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

จากรูปที่ 4.10 จะได้ว่าความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในช่วงร้อยละ 0.5 – 2.0 โดยน้ำหนัก พบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้มีปริมาณมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์มากขึ้น โดยพบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีปริมาณมากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักของน้ำมัน โดยพบมีปริมาณเท่ากับร้อยละ 58.9 โดยน้ำหนักของน้ำมัน และเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์มากกว่าร้อยละ 2 พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้มีปริมาณลดลง

4.6.1.2 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่ผลิตได้ต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 1 ขั้นตอนที่มีเบสเป็นตัวเร่ง

เมื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วในการเตรียมเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน พบว่าเมื่อใช้ตัวเร่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 และเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า เมื่ออัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมัน (โดยน้ำหนัก) เพิ่มขึ้น ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยพบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีปริมาณมากที่สุดเมื่ออัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมัน ร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก โดยมีปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันเท่ากับร้อยละ 75.6 ดังแสดงในรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่ผลิตได้ในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

4.6.2 การเตรียมไบโอดีเซลผ่านการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอนโดยมีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (two-step transesterification)

ในการเตรียมไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว โดยผ่านกระบวนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกเป็นการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งเพื่อลดปริมาณของกรดไขมันอิสระในน้ำมันที่

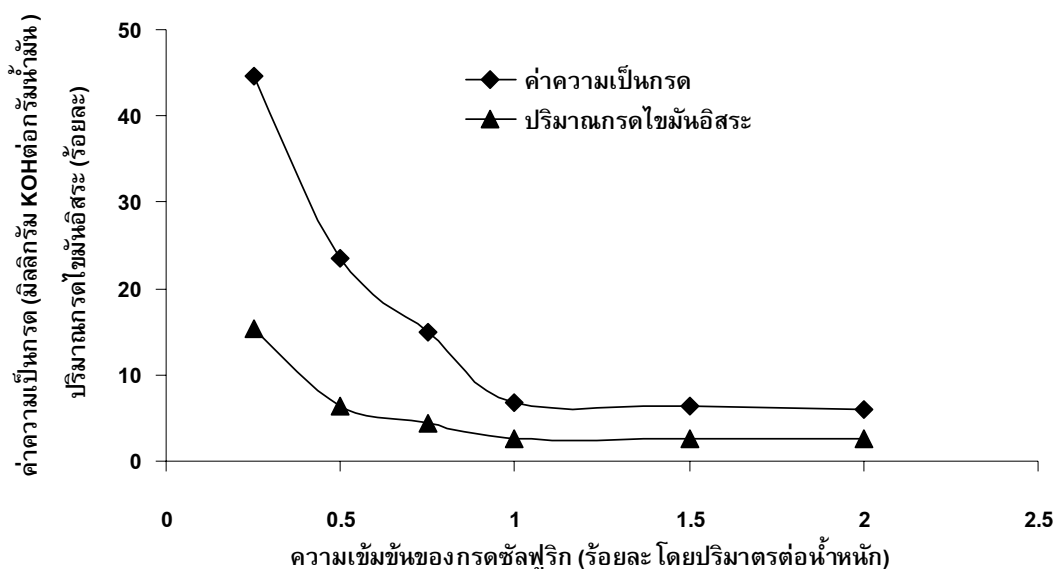
ผลิตได้ จากนั้นในขั้นตอนที่สองจะเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้สารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้การเตรียมไบโอดีเซลเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์

4.6.2.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยการเร่งด้วยกรดซัลฟูริก (acid esterification)

ในการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดซัลฟูริก และอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันที่ยีสต์ผลิตได้ โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็รรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที

1 ผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดซัลฟูริกที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันที่เชื้อผลิตได้ พบว่าได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.12 จะได้ว่าปริมาณของกรดไขมันอิสระและค่าความเป็นกรดของน้ำมันมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดและปริมาณของกรดไขมันอิสระจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 0.25 - 1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักน้ำหนัก โดยพบว่าค่าความเป็นกรดและปริมาณของกรดไขมันอิสระมีค่าน้อยที่สุดเมื่อความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกเท่ากับร้อยละ 1 และที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกมากกว่าร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักน้ำหนักพบว่าค่าความเป็นกรดและปริมาณของกรดไขมันอิสระมีลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

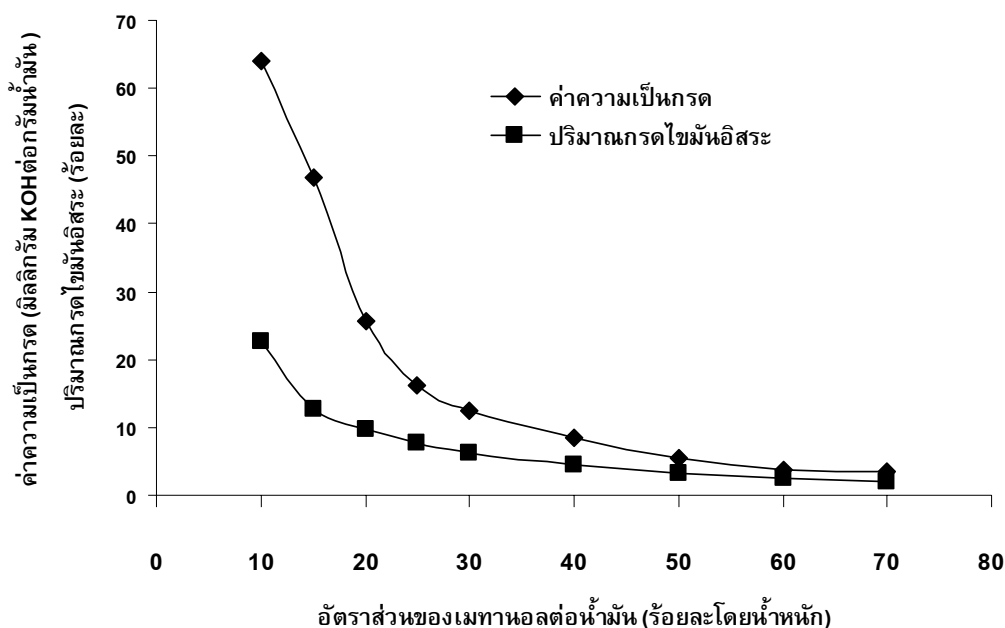


รูปที่ 4.12 ผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

2 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ในการศึกษาผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งด้วยกรดซัลฟูริก พบว่าปริมาณของเมทานอลมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยพบว่าค่าความเป็นกรดและปริมาณของกรดไขมันอิสระมีค่าลดลง เมื่ออัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าความเป็นกรดและปริมาณของกรดไขมันอิสระลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันอยู่ในช่วงร้อยละ 10 - 30 โดยน้ำหนัก และพบว่าอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันคือ

ร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก ซึ่งค่าความเป็นกรดมีค่าเท่ากับ 3.9 มิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม น้ำมัน และปริมาณของกรดไขมันอิสระพบว่ามีค่าลดลงเหลือเพียงร้อยละ 1.9 ดังแสดงในรูปที่ 4.13



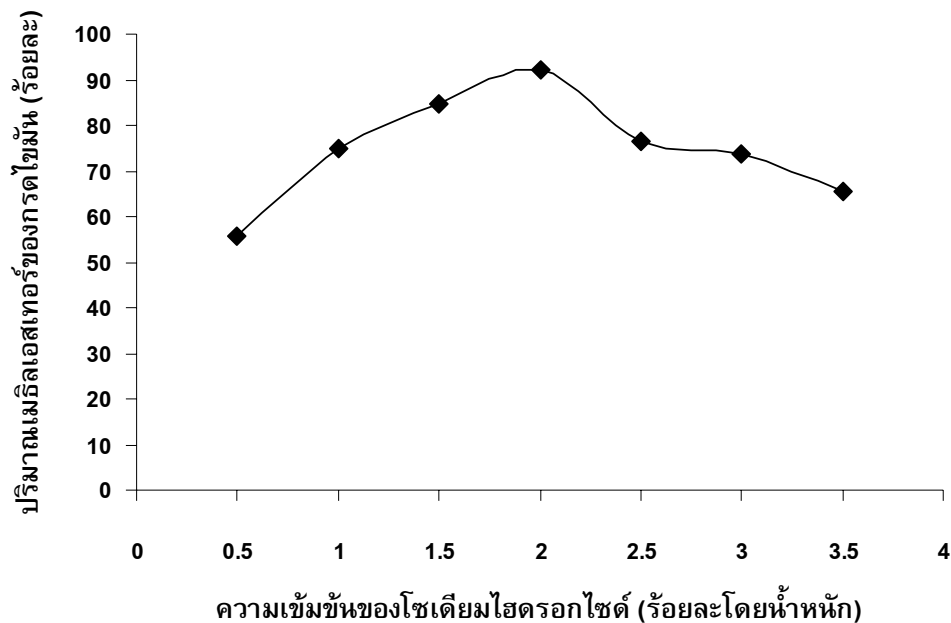
รูปที่ 4.13 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

4.6.2.2 ปฏิกิริยาการเตรียมไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งขั้นตอนที่ 2 (base - catalyzed transesterification)

ในการเตรียมไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วโดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอน พบว่าในขั้นตอนแรกได้เกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าปริมาณของกรดไขมันอิสระมีค่าลดลงเหลือเพียงร้อยละ 1.9 เท่านั้น ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งได้อย่างสมบูรณ์ได้ และจากการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันขั้นตอนที่ 2 ได้ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของโซเดียมไฮดรอกไซด์และอัตราส่วนที่เหมาะสมของเมทานอลต่อน้ำมันในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็วย้อน 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.14 จะได้ว่า ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีปริมาณมากที่สุดเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก โดยพบมีปริมาณเท่ากับร้อยละ 92.3 โดยน้ำหนักของน้ำมันและพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.5 – 2 พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีค่าเพิ่มขึ้นโดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 55.8 – 92.3 โดยน้ำหนักของน้ำมัน และเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีค่าลดลง



รูปที่ 4.14 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเคชันของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

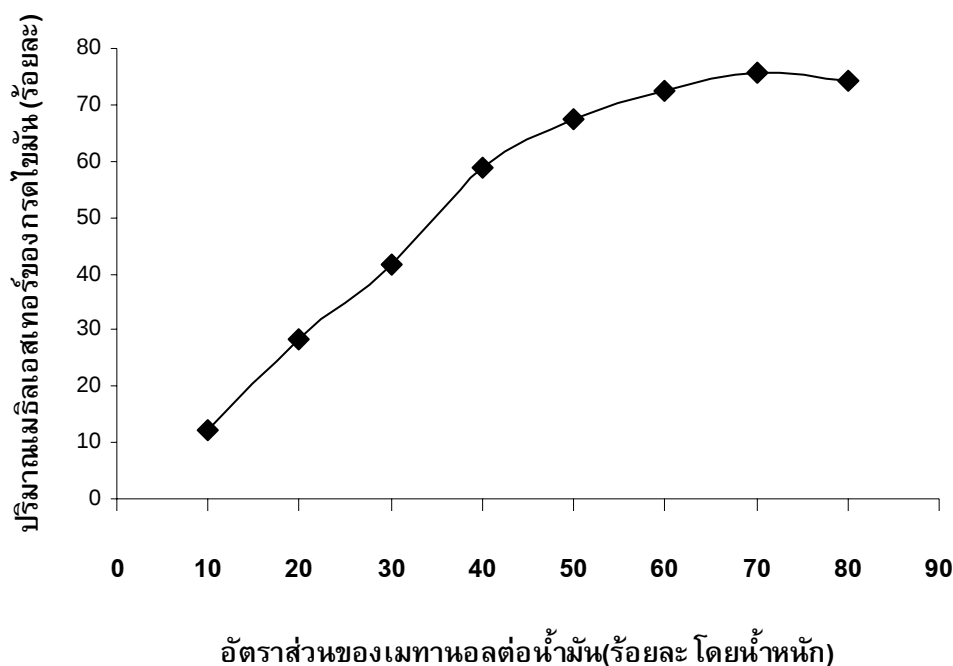
2 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์

เอสเทอร์ิฟิเคชัน

ในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันโดยเร่งด้วยเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 ในการเปลี่ยนน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน พบว่า อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันมีผลต่อปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้ ซึ่งได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.15 และจะได้ว่าอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา คือร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก และพบว่า มีปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันสูงที่สุด โดยพบมีปริมาณเท่ากับร้อยละ 97.5 และที่อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่มากกว่าร้อยละ 30 พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย

4.6.3 ปฏิกิริยาการเตรียมไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง (lipase catalyzed transesterification)

ในการเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันที่เร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส ซึ่งได้ศึกษาอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมัน อุณหภูมิและปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันได้มากที่สุด และวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้



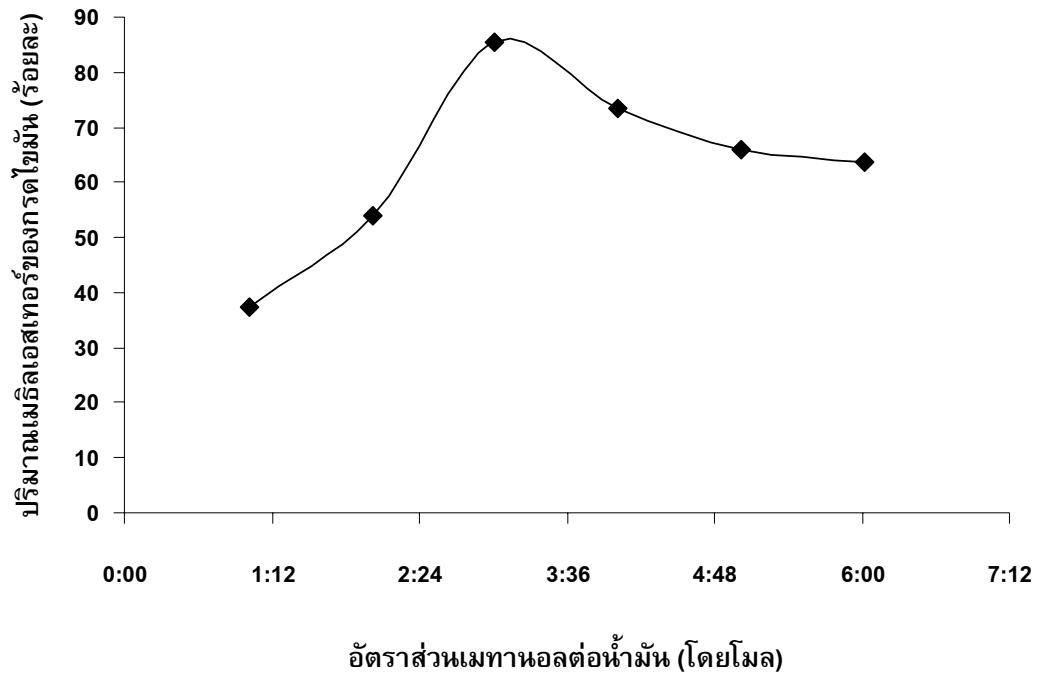
รูปที่ 4.15 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเคชันของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

4.6.3.1 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอโนไซม์เอสเทอร์ิเคชันที่เร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส

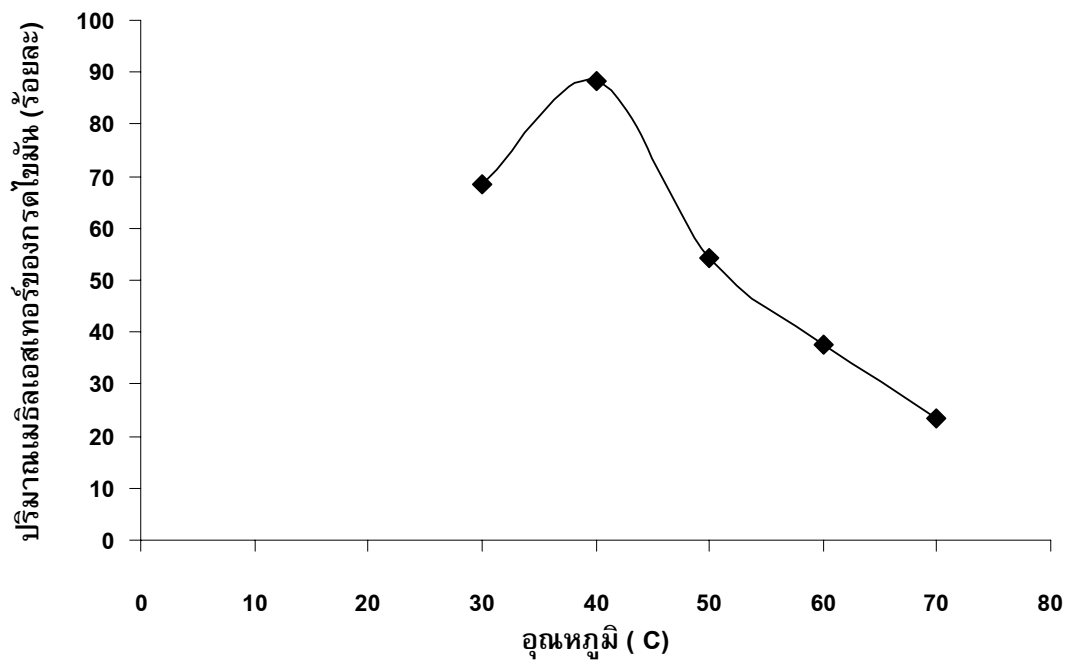
จากการศึกษาอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเคชันที่เร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสพบว่าได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.16 จะได้ว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเคชันได้ดีที่สุดเมื่ออัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก โดยพบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมากที่สุดเท่ากับ 85.6 และจากการศึกษาพบว่าเมื่ออัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันมากกว่าร้อยละ 30 พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีปริมาณลดลงเนื่องจากปริมาณของเมทานอลที่มากขึ้นมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ จึงทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง

4.6.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเคชันเมื่อเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส

การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเคชันเพื่อเปลี่ยนน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซลโดยการเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.17 โดยจะพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเคชัน คือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมากที่สุดและมีค่าเท่ากับร้อยละ 88.2 และพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสเอนไซม์ไลเปสทำงานได้น้อยลงเนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลาย



รูปที่ 4.16 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส

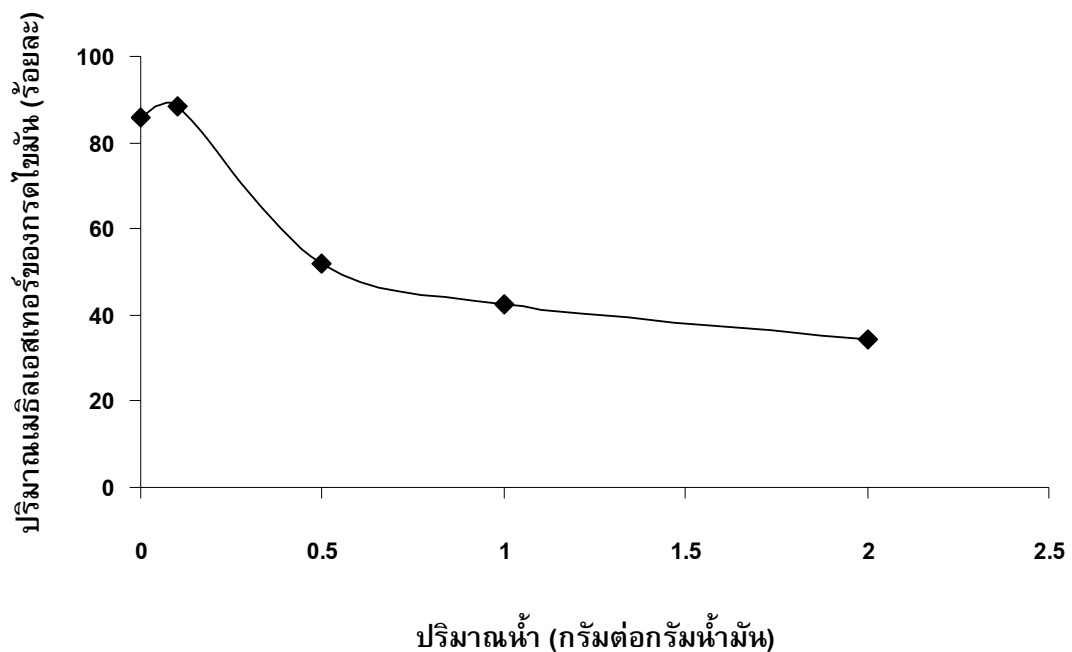


รูปที่ 4.17 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

4.6.3.3 ผลของปริมาณน้ำต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเมื่อเร่งด้วย

เอนไซม์ไลเปส

จากการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส พบว่าการทำงานของเอนไซม์ต้องมีน้ำเข้าร่วมการเกิดปฏิกิริยาด้วย ดังนั้นจากการศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสสำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่าปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสคือ 0.1 กรัมต่อกรัมน้ำมัน หรือคิดเป็นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักน้ำมัน โดยพบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วเป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้มากที่สุด โดยพบปริมาณของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีค่าเท่ากับร้อยละ 88.4 โดยน้ำหนักของน้ำมัน และพบว่าเมื่อเติมน้ำในปริมาณที่มากกว่าร้อยละ 10 พบว่าปริมาณของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้มีปริมาณลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 ผลของปริมาณน้ำที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

จากการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดแห้งด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน การย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล และการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS method) และหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Macro-Kjedahl method พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในสารสกัดจากกากสับปะรดที่สกัดด้วยน้ำร้อน มีค่าเท่ากับ 2.50 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 0.14 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าสารสกัดจากกากสับปะรดที่สกัดได้มีลักษณะเป็นของเหลวใสและมีสีเหลืองอ่อน และในการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดโดยการสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกภายใต้สภาวะหม้อนึ่งอัดความดัน พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดเท่ากับ 27.68 กรัมต่อลิตรของสารสกัดจากกากสับปะรด และมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตรสารสกัดจากกากสับปะรด และสารสกัดที่ได้มีลักษณะใสและมีสีน้ำตาลอ่อน สำหรับการสกัดกากสับปะรดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าลักษณะของสารสกัดที่ได้มีสีเหลืองอ่อนใส และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดพบว่ามีค่าเท่ากับ 6.23 และ 0.24 กรัมต่อลิตรสารสกัดจากกากสับปะรด ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของกากสับปะรดที่ได้จากโรงงานบริษัทสยามอุตสาหกรรมการเกษตรสับปะรดจำกัดของ กนกอร และอรณิชา (2550) พบว่าในกากสับปะรดแห้ง มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 57.20 และพบปริมาณโปรตีนร้อยละ 6.78 โดยจะเห็นว่าในกากสับปะรดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง และเมื่อสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ทำให้ได้ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดในปริมาณที่สูงกว่าวิธีการสกัดวิธีอื่น ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่เชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันได้ จึงได้ศึกษาการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วเพื่อผลิตน้ำมัน และในการเลือกเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดด้วยการสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2 นอร์มอล พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของพรทิพย์และวชิระ (2550) ที่ได้ศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดสด 2 วิธี คือการเตรียมสารสกัดจากกากสับปะรดด้วยการสกัดด้วยน้ำร้อนและการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล พบว่าลักษณะสารสกัดจากกากสับปะรดสดที่สกัดได้ด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนจะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 2.50 กรัมต่อลิตรสารสกัดจากกากสับปะรด และปริมาณไนโตรเจน 0.14 กรัมต่อลิตรของสารสกัดจากกากสับปะรด และสารสกัดจากกากสับปะรดที่สกัดด้วยวิธีการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ลักษณะสารสกัดที่ได้มีสีเหลืองเข้มและขุ่น มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 5.98 กรัมต่อลิตรสารสกัด และปริมาณไนโตรเจน 0.15 กรัมต่อลิตรสารสกัดจากกากสับปะรด ซึ่งจากการสกัดด้วยสารละลายกรดจะพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดมากกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน ดังนั้นสารสกัดที่เตรียมได้จากการสกัดด้วยกรดจึงเหมาะสมในการนำมาเตรียมเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อได้ จากการศึกษาของ Buzzini และ Martini (1999) ได้ศึกษาการผลิตสารแคโรทีนอยด์จากเชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis* ในอาหารที่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น สารสกัดจากแป้งข้าวเหลือง โดยเลือกใช้วิธีการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล พบว่าสารสกัดที่ได้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 52 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจน (C/N) เท่ากับ 80 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tinoi และคณะ (2004) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากเชื้อยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ในอาหารที่เป็นของเหลือจากอุตสาหกรรม ได้แก่ กากมัสตาร์ด (Mustard meal) และกาก

โปรตีนถั่วเขียวจากกระบวนการผลิตวันเส้น (Mung bean meal powder) โดยวิธีวิธีการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล และการสกัดด้วยน้ำร้อน จากการศึกษาองค์ประกอบพบว่ามีสารสกัดมาตรฐานที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนจะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 7.45 และโปรตีนร้อยละ 7.01 ของสารสกัด ส่วนสารสกัดมาตรฐานที่ได้จากวิธีการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล จะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 2.75 และโปรตีนร้อยละ 4.85 และจากการศึกษาองค์ประกอบของกากโปรตีนถั่วเขียวจากกระบวนการผลิตวันเส้นพบว่ามีสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนจะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 6.75 และโปรตีนร้อยละ 5.53 ส่วนสารสกัดมาตรฐานที่ได้จากวิธีการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล จะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 8.75 และโปรตีนร้อยละ 7.79

5.2 การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากกากสับปะรดมาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วเพื่อผลิตน้ำมัน

จากการทดลองได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้ทั้งสามวิธีมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตและผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ โดยจะศึกษาการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้ โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเท่ากับ 6.0 บมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าความสามารถในการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดที่เตรียมได้จากการสกัดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเกิดขึ้นได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรด พบว่าเชื้อยีสต์สามารถผลิตน้ำมันได้เมื่อเลี้ยงในสารสกัดจากกากสับปะรด แสดงว่า เชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากสับปะรดเพื่อการเจริญและการผลิต น้ำมันของเชื้อได้ และในการผลิตน้ำมันของเชื้อจะสามารถผลิตได้มากที่สุดเมื่อได้มีการปรับให้สภาวะแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันให้ได้มากที่สุด ดังนั้นจึงต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในสารสกัดจากกากสับปะรดต่อไป และจากผลทดลองเมื่อเปรียบเทียบการเจริญ และการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดกับอาหารมาตรฐาน พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดให้ปริมาณน้ำมันมากกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า ดังนั้นจะได้ว่ากากสับปะรดที่เป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปสับปะรดสามารถนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตน้ำมันได้ ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าได้มีการประยุกต์ใช้ของเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม และโรงงานต่าง ๆ มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำมันของจุลินทรีย์ผลิตน้ำมันปริมาณสูงได้ โดยจากการศึกษางานวิจัยของ Papanikolaou และ Aggelis (2001) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Y. lipolytica* โดยใช้กลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อยีสต์ *Y. lipolytica* มีการสะสมของไขมันในปริมาณสูงถึงร้อยละ 40 โดยน้ำหนัก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Papanikolaou และคณะ (2001) ที่ได้ศึกษาการเจริญของ *Y. lipolytica* ในกลีเซอรอลที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหาร มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 และผลผลิตน้ำมันที่ได้เป็น 0.43 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง อัตราการผลิตไขมันสะสมภายในเซลล์ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้การศึกษาของ Zhu และคณะ (2008) ที่ได้ศึกษาผลขององค์ประกอบในอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Trichosporon fermentans* พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีค่าสูงเท่ากับ 163 ค่าความ

เป็นกรดต่าง 6.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เชื้อจะมีการเจริญและผลิตน้ำมันได้ดีขึ้น และพบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 28.1 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำมันร้อยละ 64 ซึ่งปกติเมื่อเลี้ยงเชื้ออาหารทั่วไปจะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 19.4 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำมันร้อยละ 50.8 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งและยังพบว่า เชื้อ *T. fermentans* สามารถเจริญได้ในอาหารที่ได้จากกากน้ำตาลที่ยังไม่ขจัดความเป็นพิษซึ่งจะให้ปริมาณน้ำมัน 12.8 กรัมต่อลิตรของกากน้ำตาล และ Xue และคณะ(2006) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันของเชื้อ *Rhodotorula glutinis* โดยเลี้ยงในอาหารที่ได้จากน้ำเสียจากการผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมตพบว่าสามารถน้ำมันได้ร้อยละ 9.04 ± 0.11 และต่อมา Xue และคณะ (2008) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันโดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่เป็นน้ำเสียจากการผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมต และมีการเติมกลูโคสลงไปในการอาหารด้วยพบว่าเมื่อเพิ่มให้เซลล์มีการเจริญและผลิตน้ำมันมากขึ้น และเมื่อใช้วิธีการเติมกลูโคสแบบ Feed back จะให้ปริมาณเซลล์แห้ง 25 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตน้ำมันมากขึ้นด้วย โดยมีปริมาณน้ำมันเท่ากับร้อยละ 20 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ Easterling และคณะ (2009) ได้ศึกษาแหล่งของสับสเตรต ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการสะสมไขมันและการผลิตกรดไขมันของเชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis* เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารที่ประกอบด้วยกลีเซอรอล เดกซ์โตรส โซโลส ในสัดส่วนที่แตกต่างกันพบว่าการผลิตน้ำมันของเชื้อ *R. glutinis* ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยพบปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูงถึงร้อยละ 53 ซึ่งกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว นอกจากนี้ Huang และคณะ (2009) ได้ผลิตน้ำมันจากเชื้อ *Trichosporon fermentans* ในอาหารที่เตรียมได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดได้ โดยใช้เวลา 8 วัน เชื้อสามารถผลิตน้ำมันได้สูงถึงร้อยละ 40.1 หรือประมาณ 11.5 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 28.6 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อสามารถผลิตน้ำมันได้จากอาหารที่เป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตหรือจากการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรโดยเตรียมได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดได้ โดยใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญสำหรับการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อผลิตน้ำมันได้ โดยเฉพาะสารสกัดจากกากสับปะรดพบว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตน้ำมันได้ ซึ่งเป็นการลดปริมาณของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้

5.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากกากสับปะรด

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมที่มีต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วในอาหารที่เตรียมได้จากการสับปะรด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันของเชื้อได้มากที่สุด คือ เมื่อใช้ปริมาณกากสับปะรดเริ่มต้นในการเตรียมเป็นสารสกัดร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้นเป็น 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากการศึกษางานวิจัยที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันจากเชื้อยีสต์ *Y. lipolytica* ของ (Paranikolaou และคณะ, 2001) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกรดซิตริกสูง และควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 พบว่าเซลล์มีการเจริญมากที่สุดให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.5 กรัมต่อลิตร และมีการสะสมน้ำมันมากที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร ผลได้ของน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดเป็น 0.28 กรัม/น้ำหนักแห้งของน้ำมันต่อกรัม/น้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 และ 7.0 มีผลต่อการเจริญของยีสต์ที่คัดเลือกแล้วนอกจากนี้

ยังพบว่าที่ความเข้มข้นไนโตรเจนต่ำมีผลต่อการเจริญ คือ 0.5 กรัมต่อลิตร เซลล์จะมีการสะสมของน้ำมันมากที่สุด คือผลได้ของน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดเป็น 0.44 กรัมต่อน้ำหนักแห้งของน้ำมันต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และขณะเดียวกัน Papanikolaou และคณะ (2002) ซึ่งได้ศึกษาถึงผลของสภาวะต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของ *Y. lipolytica* เมื่อเพาะเลี้ยงในไขมันที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวอิสระ คือ สเตียรีน (stearin) ในปริมาณสูง โดยได้เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 28-33 องศาเซลเซียส พบปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 9-12 กรัมต่อลิตร และพบปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์เท่ากับ 0.44-0.54 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง นอกจากนี้ Li และคณะ (2008) ได้ศึกษาการนำกากน้ำตาล (sugarcane molasses) มาเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Mucor recurvus* sp. เพื่อผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว และได้ศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดไขมัน โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว คือเมื่อใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 15 ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน และพบว่าการใช้กากน้ำตาลและยูเรียเพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 35 : 1 สามารถผลิตน้ำมันได้เท่ากับ 7.13 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเท่ากับ 5.74 กรัมต่อลิตร โดยประกอบด้วยกรดลิโนเลนิก (linolenic acid, LA) 0.82 ± 0.05 กรัมต่อลิตร กรดแกมมา-ลิโนเลนิก (γ -linolenic acid, GLA) เท่ากับ 1.35 ± 0.02 กรัมต่อลิตร กรดอัลฟา-ลิโนเลนิก (α -linolenic acid, ALA) เท่ากับ 0.17 ± 0.06 กรัมต่อลิตร กรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid, ARA) เท่ากับ 0.46 ± 0.07 กรัมต่อลิตร เป็นต้น ซึ่งจะได้ว่ากากน้ำตาลถือเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งใหม่ในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว

5.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วโดยเบื้องต้นวิเคราะห์หาองค์ประกอบโดยรวมด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง พบว่าในน้ำมันที่สกัดจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วประกอบด้วย โมโนเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล ไตรเอซิลกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ และเมื่อวิเคราะห์หากรดไขมันอิสระพบว่ามีการดไขมันอิสระในปริมาณสูง คิดเป็นร้อยละ 22.7 จากนั้นเตรียมเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยใช้โบรอนไตรฟลูออไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่าในน้ำมันที่สกัดจากยีสต์นี้ มีการโอเลอิกมากที่สุดถึง 82.15 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมันที่ผลิตได้ รองลงมาคือกรดปาล์มมิก (24.40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน) และกรดลิโนเลอิก (17.57 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมัน) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อที่คัดเลือกแล้วกับยีสต์ชนิดอื่นที่สามารถผลิตน้ำมันปริมาณสูงได้ พบว่า Davoli และคณะ (2004) ได้ศึกษาการเจริญของ *R. glutinis* ATCC 26085 และ *Sporobolomyces roseus* และศึกษาการผลิตสารคาร์บอนอยและน้ำมันที่ผลิตด้วย พบว่า *R. glutinis* ATCC 26085 สามารถเจริญเติบโตโดยพบมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 6.31 กรัมต่อลิตรและ สามารถผลิตน้ำมันได้เท่ากับ 19.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ โดยองค์ประกอบของกรดไขมันส่วนใหญ่เป็นกรดโอเลอิก โดยพบอยู่ในช่วงร้อยละ 60-72 และกรดปาล์มมิก ในช่วงร้อยละ 13.4 - 20.4 ขณะเดียวกันเชื้อ *S. roseus* พบมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.82 กรัมต่อลิตร และสามารถน้ำมันได้เช่นเดียวกันและมีองค์ประกอบของกรดไขมันใกล้เคียงกันกับน้ำมันที่ได้จาก *R. glutinis* ATCC 26085 และจากงานวิจัยของ Dai และคณะ (2007) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันจาก *R. glutinis* T216 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร พบว่ามีปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้เท่ากับ 14.66 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 49.25 ของเซลล์แห้ง และเมื่อขยายสเกลการผลิตเป็นถังหมัก 5 ลิตรพบว่าเชื้อสามารถผลิตน้ำในได้ 23.41 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 60.69 ของเซลล์แห้ง โดยพบกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลักโดยพบร้อยละ 66.96 รองลงมาคือ กรด

ปาล์มิติก (ร้อยละ 18.74) นอกจากนี้ยังพบกรดลิโนเลอิก กรดไมริสติกและกรดสเตียริกด้วย และในงานวิจัยของ Easterling และคณะ (2009) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันโดย *R. glutinis* ATCC 204091 โดยใช้สารตั้งต้นต่างๆ กันโดยใช้ กลีเซอรอลกับเดกซ์โทส พบว่าน้ำมันที่ผลิตได้ จะมีกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกัน (ร้อยละ 28.46) และพบกรดสเตียริกเป็นองค์ประกอบรองลงมาด้วย นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการผลิตน้ำมันจากยีสต์สายพันธุ์อื่นด้วย โดย Papanikolaou และคณะ (2001) ได้ศึกษาการผลิตน้ำมันโดยเลี้ยงเชื้อ *Yarrowia lipolytica* ในอาหารที่เป็นกลีเซอรอลโดยเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 3.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 43 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วกับน้ำมันที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์อื่นๆ พบว่าองค์ประกอบของน้ำมันที่ผลิตได้มีความคล้ายคลึงกัน และขณะเดียวกันได้มีการศึกษาการเตรียมน้ำมันที่ได้จากเชื้อเพื่อเป็นไบโอดีเซลด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำมันที่ผลิตได้นี้สามารถที่จะนำไปเตรียมเป็นไบโอดีเซลได้ จากการศึกษาพบว่าน้ำมันจากเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้วนี้ สามารถเตรียมเป็นไบโอดีเซลได้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มแหล่งของน้ำมันที่สามารถนำมาเตรียมเพื่อเป็นไบโอดีเซลซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกอีกแหล่งหนึ่งด้วย

5.5 การสกัดน้ำมันออกจากเซลล์และการทำให้เซลล์แตกเพื่อสกัดน้ำมันจากเซลล์ยีสต์ผลิตน้ำมันในปริมาณสูงที่คัดเลือกแล้ว

จากการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer (1959) และตามวิธีของ Reese และ Gottlieb (1959) และการสกัดด้วยเครื่องชอกต์เลตด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ และการทำให้เซลล์แตกแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเลือกใช้วิธีการบดด้วยเม็ดบีด (bead beating) การใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave radiation) คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic) และการใช้ความร้อนภายใต้สภาวะหม้อนึ่งความดัน (autoclave) พบว่าการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพียงอย่างเดียวไม่สามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่าการทำให้เซลล์แตกด้วยเม็ดบีด สามารถทำให้เซลล์ยีสต์แตกและสามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้มากที่สุด โดยพบว่าการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้ปริมาณน้ำมันมีค่าเท่ากับร้อยละ 47.8 โดยน้ำหนักของเซลล์แห้ง และรองลงมาคือการสกัดน้ำมันด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟ และการสกัดภายใต้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยพบว่าการสกัดน้ำมันได้ร้อยละ 37.9 และ 34.7 ของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วจะถูกสะสมไว้ในเซลล์ของยีสต์ และผนังเซลล์ของยีสต์นี้พบว่ามีความหนาค่อนข้างมาก ทำให้ไม่สามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องใช้เทคนิคการทำให้เซลล์แตกก่อนจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อีกครั้งหนึ่ง เพื่อที่สามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้มากที่สุด โดยพบว่าการทำให้เซลล์ด้วยการบดด้วยเม็ดบีดสามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้มากที่สุด เพราะว่าแรงบดที่เกิดขึ้นระหว่างเม็ดบีดขณะทำการบดนั้นจะทำให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ถูกทำลาย ทำให้เกิดการแตกออกของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงเป็นการเพิ่มพื้นที่การสัมผัสของตัวทำละลายอินทรีย์กับไขมันภายในเซลล์ ทำให้ตัวทำละลายอินทรีย์สามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ได้มากที่สุด (Geciova และคณะ, 2002) แต่ทั้งนี้การเลือกให้วิธีการทำให้เซลล์และการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ลักษณะการสะสมของไขมันในเซลล์ องค์ประกอบและความซับซ้อนของผนังเซลล์ ความหนาของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดแยกน้ำมันออกจากเซลล์จุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำมันในปริมาณสูง โดยรัตนภรณ์ (2551) ได้เลือกใช้การสกัดแยกน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำทิ้งที่ปนเปื้อนไขมันในเขตมหาวิทยาลัยขอนแก่น ด้วยเครื่องสกัดไขมันชอกต์เลต (shxhlet extractor) โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากนี้ Zhu และคณะ (2002) ได้ศึกษาการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ของรา สายพันธุ์ *Mortierella alpina* โดยได้

เปรียบเทียบการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ของ *M. alina* ที่เป็นเซลล์เปียก (wet biomass) และเซลล์แห้ง (dry biomass) โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามวิธีของ Bligh และ Dyer เช่นกัน พบว่าการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์แห้งสามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้ดีกว่าการสกัดจากเซลล์เปียก และสามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้สูงสุดร้อยละ 41.1 นอกจากนี้ Lee และคณะ (2010) ได้มีการเปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ของจุลสาหร่าย (microalgae) โดยได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำมัน โดยสกัดภายใต้หม้อหนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 เมกกะปาสคาล เป็นเวลา 5 นาที การบดด้วยเม็ดบีดด้วยเครื่อง bead beater ที่ความเร็วรอบ 2,800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที การใช้คลื่นไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความถี่ 2450 เมกกะเฮิรตซ์ เป็นเวลา 5 นาที การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 5 นาที และการใช้แรงดันออสโมติกด้วยสารละลาย 10% โซเดียมคลอไรด์ เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 1 นาทีและตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า การสกัดน้ำมันด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟ สามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ของ *Botryococcus* sp. *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. ได้มากที่สุด ร้อยละ 10.0 – 28.6 และพบว่าการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ของสาหร่ายด้วยวิธีการบดด้วยเม็ดบีดด้วยเครื่อง bead beater สามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ของ *Botryococcus* sp. ได้มากที่สุดเช่นเดียวกับการใช้คลื่นไมโครเวฟ โดยสามารถสกัดน้ำมันได้ร้อยละ 28.1 และจากการศึกษาการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์พบว่าวิธีการสกัดด้วยการใช้เม็ดบีดสามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้ดีที่สุด แต่เนื่องจากการใช้เม็ดบีด อาจไม่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ ดังนั้นอาจต้องเลือกใช้วิธีการสกัดด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟ หรือการใช้ความร้อนภายในหม้อหนึ่งความดันไอ เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับสเกลใหญ่ต่อไปได้

5.6 การเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ผลิตน้ำมันปริมาณสูงที่คัดเลือกแล้วโดยผ่านการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ในการเตรียมไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วผ่านกระบวนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยได้ศึกษาและเปรียบเทียบกระบวนการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยใช้ตัวเร่ง 3 แบบ คือ การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 1 ขั้นตอนโดยมีเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (one-step alkali base catalyzed transesterification) การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอน (two-step acid-base transesterification) โดยขั้นตอนแรกเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยการเร่งด้วยกรด (acid esterification) และขั้นตอนที่สองเป็นเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเบสเป็นตัวเร่ง และการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (lipase catalyzed transesterification) และได้ศึกษาตัวแปรที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วด้วย

จากการศึกษาพบว่าการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการเปลี่ยนน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันแบบ 2 ขั้นตอน พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำมันเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้มากที่สุด โดยพบปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับร้อยละ 97.5 โดยน้ำหนักของน้ำมันภายใต้สภาวะการเกิดปฏิกิริยาแบบ 2 ขั้นตอนโดยขั้นแรกเป็นการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยกรดซัลฟูริก เมื่อความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักน้ำมัน และอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก ภายใต้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเกิดปฏิกิริยาขั้นตอนที่สอง โดยความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก ภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และรองลงมาก็คือการเตรียม

เป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสพบว่าสามารถเตรียมได้เท่ากับร้อยละ 88.4 โดยน้ำหนักของน้ำมัน เมื่ออัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 30 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำที่เหมาะสมร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อน้ำมัน เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และการเตรียมแบบ 1 ขั้นตอนโดยมีเบสเป็นตัวเร่ง พบมีปริมาณของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันเท่ากับร้อยละ 75.6 โดยน้ำหนักของน้ำมัน ภายใต้สภาวะที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักของน้ำมัน อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 70 ภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากการศึกษาพบว่าการเตรียมไบโอดีเซลหรือเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วพบว่าการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอนเป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องจากว่าน้ำมันที่ผลิตได้มีค่าความเป็นกรดและปริมาณของกรดไขมันอิสระในปริมาณที่สูงมาก โดยมีค่าเท่ากับ 63.93 มิลลิกรัมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน และร้อยละ 22.7 โดยน้ำหนักของน้ำมันตามลำดับ ทำให้การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 1 ขั้นตอนที่มีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากปริมาณของกรดไขมันอิสระในปริมาณสูงสามารถเกิดปฏิกิริยาสะปอนิฟิเคชันหรือเกิดสบู่ขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ปริมาณของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันลดลง และมีผลต่อการแยกชั้นของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล โดยเกิดการแยกชั้นไม่ชัดเจนทำให้เกิดความยุ่งยากในการแยกเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันออกจากกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์ได้ สำหรับการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอนนั้น ในขั้นตอนแรกเป็นการกำจัดหรือลดปริมาณของกรดไขมันอิสระออกจากน้ำมันโดยเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยกรดก่อนส่วนใหญ่นิยมใช้กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก โดยต้องลดปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันให้มีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 1 และมีค่าความเป็นกรดน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน จากนั้นเปลี่ยนน้ำมันที่ผลิตได้ที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระในปริมาณต่ำให้เป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันด้วยการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์อีกครั้งหนึ่ง ทำให้การเปลี่ยนเป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันเกิดได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับตัวแปรที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันคือ ความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ นอกจากนี้ปริมาณของเมทานอลที่เข้าร่วมปฏิกิริยามีความสำคัญมากในการเปลี่ยนน้ำมันไปเป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ซึ่งพบว่าการทดลองจะได้ว่าปริมาณของเมทานอลที่เข้าทำปฏิกิริยากับน้ำมันจะต้องใช้ในปริมาณที่มากเกินไป ถึงแม้ว่าในทางทฤษฎีปริมาณการใช้เมทานอลต่อน้ำมันที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาคืออัตราส่วนโดยโมล 3 : 1 แต่ต้องเติมให้มากเกินไปเพื่อให้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้ได้ร้อยละของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในปริมาณสูงเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระในปริมาณสูงนั้น ต้องเตรียมผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอน จึงสามารถได้ผลผลิตเป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซลในปริมาณที่สูงได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ghadge และ Raheman (2005) ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระในปริมาณสูง โดยศึกษาการเตรียมน้ำมันจากเมล็ด *Madhuca indica* ซึ่งพบว่าปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 15 โดยได้เตรียมไบโอดีเซลผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอนเช่นเดียวกัน ซึ่งในขั้นตอนแรกเร่งปฏิกิริยาโดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมัน 0.30-0.35 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงซึ่งพบว่าสามารถลดปริมาณของกรดไขมันอิสระออกจากน้ำได้ โดยมีค่าเป็นกรดเท่ากับ 2 มิลลิกรัมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน หลังจากเกิดปฏิกิริยาโดยการเร่งด้วยเบสโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมัน 0.25 โดยปริมาตร และพบว่าปริมาณเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีค่าเท่ากับร้อยละ 98

เช่นเดียวกับการศึกษาของ ของ Berchmans และ Hirata (2008) ได้พัฒนาวิธีในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดสบู่ดำ *Jatropha curcas* L. ซึ่งพบว่ามีองค์ประกอบของกรดไขมันในปริมาณสูงประมาณร้อยละ 15 และจากการทดลองได้เปรียบเทียบการเตรียมไบโอดีเซลผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 1 ขั้นตอน และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอน และพบว่า การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอนสามารถลดปริมาณกรดไขมันอิสระลดเหลือน้อยกว่าร้อยละ 1 โดยขั้นตอนแรกเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยการเร่งด้วยกรด ซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 0.6 กรัมต่อกรัมไขมัน ภายใต้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 60 นาที และขั้นตอนที่สองเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งด้วยความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมัน 1.4 กรัมต่อกรัมไขมัน อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 0.24 กรัมต่อกรัมไขมัน ภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และพบว่าปริมาณเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้มีค่าเท่ากับร้อยละ 90 เมื่อเกิดปฏิกิริยาเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ขณะเดียวกัน Yang และคณะ (2008) ได้ศึกษาการเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันของเมล็ด *Zanthoxylum bungeanum* Maxim ซึ่งเป็นน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระในปริมาณสูงเช่นเดียวกันและมีค่าความเป็นกรดสูงถึง 63.56 กรัมโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ดังนั้นจึงต้องเตรียมไบโอดีเซลผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอนเพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิสระและสามารถเตรียมไบโอดีเซลได้อย่างสมบูรณ์และได้ปริมาณที่มากที่สุด โดยพบว่าปริมาณกรดไขมันอิสระลดลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 1 เมื่อเร่งปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 2 โดยเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทานอลโดยมีอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 20-25:1 เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และพบว่าปริมาณเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซลที่ได้มีปริมาณร้อยละ 96 เมื่อเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันขั้นตอนที่สองเมื่อเร่งด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.9 อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 6.5 :1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และพบว่าไบโอดีเซลที่เตรียมได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซลและสามารถใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลได้ นอกจากนี้ Patil และ Deng (2009) ได้เตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันที่บริโภคไม่ได้ เช่น น้ำมันจากสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) และ น้ำมันจาก *karanja* (*Pongamia glabra*) และเตรียมจากน้ำมันที่บริโภคได้เช่น น้ำมันข้าวโพด 9corn oil) และน้ำมัน canola โดยได้เปรียบเทียบวิธีการเตรียมไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสม และวิเคราะห์ความแตกต่างทางด้านคุณสมบัติของน้ำมันต่าง ๆ ในการเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงและตัวแปรที่สำคัญในการเตรียมไบโอดีเซล และได้เตรียมไบโอดีเซลผ่านกระบวนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 1 ขั้นตอนสำหรับน้ำมันเพื่อการบริโภคและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอนสำหรับน้ำมันที่บริโภคไม่ได้ที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระในปริมาณสูง พบว่าจากการเตรียมไบโอดีเซลพบว่าได้ปริมาณเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมจากน้ำมันเมล็ดสบู่ดำ *J. curcas* เท่ากับร้อยละ 90-95 เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมัน *P. glabra* เท่ากับร้อยละ 80-85 เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมัน canola เท่ากับร้อยละ 80-95 และเตรียมจากน้ำมันข้าวโพดได้เท่ากับร้อยละ 85-96 เมื่อใช้โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและได้เปรียบเทียบไบโอดีเซลที่เตรียมได้ตามมาตรฐาน ASTM และพบว่าไบโอดีเซลที่เตรียมได้จากน้ำมันจาก *J. curcas* และน้ำมันข้าวโพด มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันปิโตรเลียมดีเซลทั่วไป

สำหรับตัวเร่งที่เป็นเอนไซม์ไลเปสพบว่าการเร่งการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลได้ค่อนข้างดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Winayanuwattikun และคณะ (2008) ได้ศึกษาการเตรียมไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชในประเทศไทยโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยเลือกใช้พืชไขมันที่เพาะปลูกในประเทศที่สามารถผลิตน้ำมันได้มากกว่าร้อยละ 25 จำนวน 27 ชนิด 44 สายพันธุ์ และได้เตรียมไบโอดีเซลโดยเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดเนนเอนไซม์ไลเปสที่ใช้คือ Novozyme 435 และ Lipozyme RM IM. โดยมีอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 : 1

ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันปาล์ม (*Elaeis guineensis*) น้ำมันเมล็ดสับปะรด (*Jatropha curcas*) น้ำมันจากมะละกอ (*Carica papaya*) และน้ำมันจากเงาะ (*Nephelium lappaceum*) มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้เตรียมเป็นไบโอดีเซลได้ แต่ปฏิกิริยานี้เกิดได้ค่อนข้างช้าทำให้ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลค่อนข้างนาน และราคาของเอนไซม์ทางการค้ามีราคาแพง อาจส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูงตามไปด้วย โดยเฉพาะเมื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นในการเตรียมไบโอดีเซลโดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น จึงได้พัฒนาการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ปริมาณมากขึ้นโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงเซลล์แล้ว จากการศึกษาของ Nie และคณะ (2006) พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida* sp. ที่ผ่านการตรึงบนผิวเส้นใยผ้า (textile membrane) สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากน้ำมัน salad ได้สูงถึงร้อยละ 96 โดยเติมปริมาณเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลต่อน้ำมัน 1 : 1 ทุก 10 ชั่วโมง ปริมาณน้ำร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของน้ำมัน และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการผลิตไบโอดีเซลโดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อดีในด้านการลดการเกิดมลพิษต่าง ๆ ส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อม สามารถแยกผลพลอยได้เช่นกลีเซอรอลออกได้ง่าย และสามารถได้ไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น (Fukuda และคณะ, 2001) และ เมื่อพัฒนาเกี่ยวกับความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงเซลล์จะสามารถลดต้นทุนในการผลิตพลังงานต่อไปได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

จากการผลิตน้ำมันจากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วพบว่ายีสต์ที่คัดเลือกแล้วโดยประยุกต์ใช้สารสกัดจากผลพลอยได้หรือของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปผักและผลไม้ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมแปรรูปสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีและเชื่อมีการสะสมไขมันได้ปริมาณสูง โดยพบว่ายีสต์ที่คัดเลือกแล้วสามารถผลิตน้ำมันได้ปริมาณร้อยละ 47.8 โดยน้ำหนักของน้ำมัน และน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์ที่คัดเลือกแล้วสามารถเตรียมเป็นไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบ 2 ขั้นตอนได้ และพบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ร้อยละ 97.5 โดยน้ำหนักของน้ำมัน และจากงานวิจัยพบว่าการสะสมและการผลิตน้ำมันของยีสต์ที่คัดเลือกแล้วสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำมันจากยีสต์ได้ โดยการนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดเลือกแล้วสามารถผลิตน้ำมันในปริมาณที่สูงขึ้นได้ และจากการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ยีสต์พบว่าเป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการได้ปริมาณของน้ำมันจากเซลล์น้อยลง ซึ่งต้องพัฒนาวิธีการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ให้ได้มากที่สุดหรือพัฒนาสายพันธุ์ของยีสต์ให้สามารถผลิตน้ำมันออกจากเซลล์แทนการผลิตและสะสมไว้ในเซลล์ ซึ่งจะสามารถลดขั้นตอนและต้นทุนในการสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้อีกทางหนึ่งด้วย

เอกสารอ้างอิง

- กนกกร เกียรติเกียรติกำจร และอรณิชา พัฒนะกุลพงศ์. 2550. การศึกษากระบวนการสกัดไขมันอาหารจากกากสับปะรด.โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กองอาหารสัตว์. กรมปศุสัตว์. 2520. ผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์เอกสารทางวิชาการฉบับโรเนียว
- จารุพันธ์ ทองแถม. 2519. การศึกษาลักษณะประจำพันธุ์และคุณภาพของผลสับปะรดพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย. *เกษตรสาร.* 7(2): 163 – 183.
- จารุพันธ์ ทองแถม. 2526. สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา. 2547. การใช้เศษเหลือและผลพลอยได้จากกากสับปะรดเป็นอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2547. 562-581.
- พรทิพย์ สอนวงษ์ และวชิระ แซ่หลี่. 2550. การประยุกต์ใช้กากสับปะรดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula glutinis*. โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- รัตนภรณ์ ลีสิงห์ 2551. การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง. *KKU Sci.J.* 36 : 129-138.
- Akimoto, M., Iishi, T., Yamagaki, Ohtaguchi, K., Koide, K. and Yazawa, K. 1990. Production of eicosapentaenoic acid by a bacterium isolated from mackerel intestine. *JOACS.* 67 : 911-915.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists. (W. Horwitz, Ed.). 15th edn. Method 989.05. Association of Official Analytical Chemists., Arlington, U.S.A.
- Bannerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, D.C. 2002. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 245-279.
- Berchmans, H.J. and Hirata, S. 2008. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresource Technol.* 99:1716-1721.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Buzzini, P. and Martini, A. 1999. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technol.* 71: 41-44.
- Certik, M. and Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 1-14.
- Chen, H-C. and Liu, T-M. 1997. Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata*. *CCRC 31840. Enzyme Microb. Technol.* 21: 137-142.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
- Davoli, P., Mierau, V. and Weber, R.W.S. 2004. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40 : 392–397.
- Dunahay, T.G., Jarvis, E.E., Dais, S.S. and Roessler, P.G. 1996. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57-58: 223-231.

- Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R. and Licha, M. 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour. Technol.* 100 : 356 – 361.
- Eroshin, V.K., Satroutdinov, A.D., Dedyukhina, E.G. and Chistyakova, T.C. 2000. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis. *Process Biochem.* 35: 1171-1175.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92 : 405-416.
- Geciova, J., Bury, D. and Jelen, P. 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. *Inter. Dairy J.* 12 : 541-553.
- Ghadge, S.V. and Raheman, H. 2005. Biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil having high free fatty acids. *Biomass Bioenerg.* 28:601-605.
- Guschina, I.A. and Herwood, J.L. 2006 Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45: 160-186.
- Hammond, E.G. and 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.
- Hiruta, O., Yamamura, K., Takabe, H., Futamura, T., Iinuma, K. and Tanaka, H. 1997. Application of maxblend fermentor for microbial processes. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 79-86.
- Huang, C., Zong, M-H., Wu, H. and Liu, Q-P. 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresour. Technol.* 100 : 4535-4538.
- Laning, S.J. 1991. Biotechnology and Food ingredients : Fats, Oils, Fatty Acid. And Oilseed Crops. In eds. Goldberg I. and Williams R. van Nostrand Reinhold. New York. pp:265-285.
- Leman, J. 1997. *Advances in Applied Microbiology* Volum 43. Academic Press, Inc.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S-Y., Ahn, C-Y. and Oh, H-M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.* 101 : 575 – 577.
- Li, N., Deng, Z-N., Qin, Y-L., Chen, C-L. and Liang, Z-Q. 2008. Production of polyunsaturated fatty acids by *Mucor recurvus* sp. with sugarcane molasses as the carbon source. *Food Technol. Biotechnol.* 46 : 73-79.
- Metzger, P. and Largeau, C. 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 66: 486-496.
- Manirakiza, P., Covaci, A. and Schepens, P. 2001. Comparative study on total lipid determination using soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer extraction methods. *J. Food Compos. Anal.* 14: 93-100.
- Nakabara, T., Yokochi, T., Kamisaka, Y. and Suzuki, O. 1992. Gamma-linolenic acid from genus *Mortierella*. In Kyle, D.J. and Retledge, C. (ed.). *Industrial application of single cell oils*. AOCE Press Champaign. pp : 61-97.

- Nie, K., Xie, F., Wang, F. and Tan, T. 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel : Optimization of the biodiesel production. J. Mol. Catal. B: Enzym. 43: 142-147.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. 2001. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. Antonie van Leeuwenhoek. 80 : 215-224.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and 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.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. Bioresour. Technol. 82: 43-49.
- Papanikolaou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. 2004. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. Bioresour. Technol. 95: 287-291.
- Patil, P.D. and Deng, S. 2009. Optimization of biodiesel production from edible and non-edible vegetable oils. Fuel. 88:1302-1306.
- Perrier, V., Dubreucq, E. and Galzy, P. 1995. Fatty acid and carotenoids composition of *Rhodotrula* strains. Arch. Microbiol. 164: 173-179.
- Ratlledge, C. 1992. Microbial lipids: commercial realities or academic curiosities. In Kyle, D.J. and Ratlledge, C.(ed.) Industrial application of single cell oils. AOCS Press Champaign. p 1-14.
- Roessler, P.G., Dunahay, L.M., Heacox, T.G. Jaavis, E.E. and Schneider, J.C. 1994. Genetic-engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae. ACS Symp. Ser. 566: 255-270.
- Ratlledge, C. 1990. Oils and Fats : Production, Degradation and Utilization by Yeasts. In eds. H. Verachtert and Rene de Mot, Marcel Dekker Inc, pp : 223-251
- Sawayama, S., Inoue, S., Dote, Y. and Yokoyama, S-V. 1995. CO₂- fixation and oil production through microalga. Energy Convers. Manag. 36: 729-731.
- Shimizu, S., Kawashima, h., Shinmen, Y., Akimoto, K., Yamada, H. and Jarfonfimonkol, S. 1989. Stimulatory effect of peanut oil on the production of dihomolinenic acid by filafungi. Aric. Biol. Chem. 53: 1437-1438.
- Shirasaka, N. and Shimizu, S. 1995. production of eicosapentapentaenoic acid by *Saprolegnia* sp. 28YTF-1. JAOCS. 72 : 1545-1549.
- Shechau, J., Dunahay, T.G., Benemann, J. And Roessler, P.G. 1998. A look back at the U.S. Depeartmant of Energy's Aquatic SPECIES Program-biodiesel from algae. National renewable energy Laboratory, Goldern, CO: Report NREL/TPP-580-24190.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. J. Biosci. Bioeng. 101: 87-96.
- Tinoi, J., Rakariyatham, N., and Deming, R.L. 2004. Use of mustard meal media as substrate for astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Chiang Mai J. Sci. 31:293-302.

- Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyananon, K., Tantong, S., Thakernkarnkit, W., Chulalakasanankul, W. and Yongvanich, T. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. 32 : 1279-1286.
- Xue, F., Zhang, X., Lao, H. and 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. and Tan, T. 2008. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresour. Technol. 99 : 5923 – 5927.
- Yang, F-X., Su, Y-Q., Li, X-H., Zhang, Q. and Sun, R-C. 2008. Studies on the preparation of biodiesel from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim seed oil. J. Agric. Food Chem. 56: 7891-7896.
- 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. and Kondo, K. 1988. Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. J. Biochem. 103 : 5.
- Zhu, M., Zhou, P.P and Yu, L.J. 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpine* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. Bioresour. Technol. 84 : 93-95.
- Zhu, L.Y., Zong, M.H. and Wu, H. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. 99:7881-7885.
- ไบโอดีเซลในประเทศไทย.[Online]
Available : www.bangchak.co.th/th/energy.asp?catID=2,25/3/2008
- พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล. 2550. องค์ประกอบทางโภชนาการในปลา
Available : <http://lib2.dss.go.th/elib/cgi-bin/opacexe.exe> 9/10/2008
- ศิริวรรณ. 2550. การควบคุมคุณภาพน้ำมันไบโอดีเซล.[Online]
Available : www.dss.go.th/dssweb2st-articles/files/cp_2_2550_biodesel.pdf, 20/3/2008
- Biodiesel เชื้อเพลิงชีวภาพแห่งยุคสมัย.[Online]
Available : www.barascientific.com/bscnews/forum/Biodiesel/biodiesel_4.php, 25/3/2008
- 10 เหตุผลที่ต้องใช้ ไบโอดีเซล.[Online]
Available: www.geocities.com/samoethong/index.html, 25/3/2008