



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การคัดเลือกและการเพาะเลี้ยงยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูงเพื่อ

ผลิตไบโอดีเซล

Isolation and cultivation of locally oleaginous yeasts
for biodiesel production

โดย

ดร. รัตนภรณ์ ลีสิงห์ และคณะ

มีนาคม 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การคัดเลือกและการเพาะเลี้ยงยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูงเพื่อผลิตไบโอดีเซล

Isolation and cultivation of locally oleaginous yeasts for
biodiesel production

คณะผู้วิจัย

ดร. รัตนภรณ์ ลีสิงห์

รศ. ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ

ดร. กอบกุล เหล่าเที่ยง

สังกัด

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ

เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5180251

ชื่อโครงการ: การคัดเลือกและการเพาะเลี้ยงยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูงเพื่อผลิตไบโอดีเซล

ชื่อนักวิจัย ดร. รัตนภรณ์ ลิสิงห์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อีเมล: ratlee@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ

การคัดแยกยีสต์ไขมันสูงจากตัวอย่างดินจำนวน 101 ตัวอย่าง ได้ยีสต์จำนวน 155 ไอโซเลทและยีสต์ไอโซเลท YU5/2 มีศักยภาพสูงในการผลิตลิปิด โดยสภาวะที่ยีสต์ YU5/2 ผลิตลิปิดได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะในอาหาร Lipid accumulation medium ปริมาตร 50 mL ในฟลาสก์ 250 mL คือ กลูโคส 80 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L บ่มเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน ปริมาณ Ca^{2+} 25 mg/L, Mn^{2+} 0.05 mg/L, Zn^{2+} 4.0 mg/L, Mg^{2+} 1.5 g/L, Cu^{2+} 0.3 mg/L, Fe^{2+} 18 mg/L โดยได้ เซลล์ 7.88g/L ปริมาณลิปิด 3.50 g/L หรือ 44.48%โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.44g/L/d เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบบกะและกะบ้อนในฟลาสก์ 2L ปริมาตรอาหาร 1.5L พบว่าแบบกะบ้อนได้ปริมาณลิปิด 6.9g/L หรือ 44.38%DCW อัตราการผลิตลิปิด 0.69g/L/d ส่วนการหมักแบบกะได้ปริมาณลิปิด 4.06g/L (42.73%DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.41g/L/d เมื่อแบ่งเอกลักษณ์ยีสต์ไอโซเลท YU5/2 โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26SrDNA พบว่าเป็นยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2 องค์ประกอบหลักของลิปิดที่ผลิตโดยยีสต์ *T. globosa* YU5/2 คือกรดปาล์มมิก กรดสเตียริก กรดปาล์มมิโตเลอิกและกรดโอเลอิก เมื่อผลิตไบโอดีเซลในรูป Fatty acid methyl esters (FAMES) พบว่า FAMES มีปริมาณค่าของกรดเท่ากับ 3.929 mgKOH/gFAME และปริมาณไบโอดีเซลร้อยละ 69.1 ของน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ การศึกษาในขั้นต่อไปจะเป็นการขยายขนาดเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะบ้อนรวมทั้งใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก

คำสำคัญ : ยีสต์ไขมันสูง *Torulaspora globosa* YU5/2 ไบโอดีเซล

Abstract

Project Code: MRG5180251

Project Title: Isolation and cultivation of locally oleaginous yeasts for biodiesel production

Investigator: Dr. Ratanaporn Leasing

E-mail Address: ratlee@kku.ac.th

Project Period: 2 years

Abstract:

A total of 155 yeast isolates were isolated from 101 soil samples, it was found that the yeast isolate YU5/2 could produce higher amount of lipid than any other isolated yeasts in this study. Under the optimal conditions (glucose 80 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L, Ca^{2+} 25 mg/L, Mn^{2+} 0.05 mg/L, Zn^{2+} 4.0 mg/L, Mg^{2+} 1.5 g/L, Cu^{2+} 0.3 mg/L, Fe^{2+} 18 mg/L), 7.88g/L of the dry cell mass, 3.5g/L of lipid with lipid content of 44.8%DCW and lipid production rate of 0.44g/L/d were obtained in the culture of the yeast isolate YU5/2 after 8 days of fermentation, 130rpm at 30°C. In fed-batch fermentation with 1.5L of working volume, lipid of 6.9g/L (44.38%DCW) and lipid production rate of 0.69g/L/d were obtained, while 4.06g/L of lipid (42.73%DCW) and lipid production rate of 0.41g/L/d were found in batch fermentation. To identify the isolated yeast, sequence analysis of the variable D1/D2 domain of 26S rRNA was performed. BLAST analysis of the 26S rRNA gene sequence of the yeast isolate YU5/2 was revealed to be a perfect match with that of *Torulaspora globosa* type strain. The major constituent fatty acids of extracted lipid were palmitic acid, stearic acid, palmitoleic acid and oleic acid. Biodiesel or fatty acid methyl esters (FAMES) production was investigated, the FAMES yield of 69.1% from dried cell was found and acid value of 3.929 mgKOH/gFAMES was obtained. In future works, large-scale fed-batch fermentation will be investigated and then low cost of carbon sources will be studied.

Keywords: Oleaginous yeast, *Torulaspora globosa* YU5/2, biodiesel

Executive summary

ชื่อโครงการ การคัดเลือกและการเพาะเลี้ยงยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูงเพื่อผลิตไบโอดีเซล (Isolation and cultivation of locally oleaginous yeasts for biodiesel production)

ชื่อหัวหน้าโครงการ นางสาวรัตนภรณ์ ลีสิงห์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002 โทรศัพท์ 0-4320-237, E-mail: ratlee@kku.ac.th,

สรุปโครงการวิจัย

ปัจจุบันงานวิจัยการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ศึกษาในสเกลขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากให้ผลผลิตมวลเซลล์และลิปิดสูงและองค์ประกอบของลิปิดเป็นไตรกลีเซอไรด์เช่นเดียวกับที่พบในพืชน้ำมัน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์หลักเพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตลิปิดจากตัวอย่างดิน จากการศึกษาสามารถคัดเลือกได้ยีสต์ 155 ไอโซเลทจากดิน 101 ตัวอย่างและยีสต์ไอโซเลท YU5/2 มีศักยภาพสูงในการผลิตลิปิด โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงคืออาหาร Lipid accumulation medium ที่มีกลูโคส 80 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L ปริมาณ Ca^{2+} 25 mg/L, Mn^{2+} 0.05 mg/L, Zn^{2+} 4.0 mg/L, Mg^{2+} 1.5 g/L, Cu^{2+} 0.3 mg/L, Fe^{2+} 18 mg/L บ่มเขย่าที่ 130 rpm, 30 °C, 8 วัน พบว่าได้เซลล์ 7.88g/L ปริมาณลิปิด 3.50 g/L หรือ 44.48%โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.44g/L/d เมื่อขยายขนาดการเพาะเลี้ยงแบบกะและกะป้อนในฟลาสก์ 2L ปริมาตรอาหาร 1.5L พบว่าแบบกะป้อนได้ปริมาณเซลล์ 15.54g/L ปริมาณลิปิด 6.9g/L หรือ 44.38%DCW อัตราการผลิตลิปิด 0.69g/L/d ส่วนการหมักแบบกะได้ปริมาณเซลล์ 9.51g/L ปริมาณลิปิด 4.06g/L (42.73%DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.41g/L/d เมื่อแบ่งเอกลักษณ์ยีสต์ไอโซเลท YU5/2 โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26SrDNA พบว่าเป็นยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2 องค์ประกอบหลักของลิปิดที่ผลิตโดยยีสต์ *T. globosa* YU5/2 คือกรดปาล์มติก กรดสเตียริก กรดปาล์มมิโตเลอิกและกรดโอเลอิก โดยเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวร้อยละ 54.13% และกรดไขมันอิ่มตัวร้อยละ 45.87 ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด เมื่อผลิตไบโอดีเซลในรูปแบบ Fatty acid methyl esters (FAMES) พบว่า FAMES มีปริมาณค่าของกรดเท่ากับ 3.929 mgKOH/gFAME และปริมาณไบโอดีเซลร้อยละ 69.1 ของน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2551 สัญญาเลขที่ MRG5180251 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง “การคัดเลือกและการเพาะเลี้ยงยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูงเพื่อผลิตไบโอดีเซล Isolation and cultivation of locally oleaginous yeasts for biodiesel production”

ขอขอบคุณ รศ. ดร. เพ็ญจิตร์ ศรีนพคุณ และ ดร. กอบกุล เหล่าเที่ยง สำหรับคำปรึกษาแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ ขอขอบคุณคุณอุษิเชษฐ์ ศรีวิชา สำหรับความช่วยเหลือในการวิจัยการคัดแยกยีสต์ ขอขอบคุณ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดขอนแก่น ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

รัตนภรณ์ สีสิ่ง

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มีนาคม 2556

สารบัญเรื่อง

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract).....	ข
บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญเรื่อง.....	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (List of Abbreviations).....	ท
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล.....	30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	71
บรรณานุกรม.....	77
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีวิเคราะห์	81
ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบจากการทดลอง.....	88
ภาคผนวก ค การเผยแพร่ผลงานวิจัยและการถ่ายทอดเทคโนโลยี.....	106

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Fukuda et al., 2001).....	4
รูปที่ 2.2 ต้นทุนทั่วไปในการผลิตไบโอดีเซล (ดัดแปลงจาก Lim and Teong, 2010).....	7
รูปที่ 2.3 แสดงการวัฏจักรของ citrate/malate cycle ในจุลินทรีย์ไขมันสูง, Enzymes : 1, pyruvate decarboxylase; 2, malate dehydrogenase; 3, malic enzyme; 4, pyruvate dehydrogenase; 5, citrate synthase; 6, ATP:citrate lyase; 7, citrate/malate translocase. (Ratledge, 2004).....	11
รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์กรดไขมันพาลมิติคในไซโตพลาสซึม.....	12
รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์.....	13
รูปที่ 4.1 การแยกยีสต์จากตัวอย่างดินด้วยการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนยีสต์ในอาหารสูตรสมบูรณ์ (Enrichment medium).....	30
รูปที่ 4.2 การแยกให้ได้เชื้อยีสต์บริสุทธิ์บนผิวหน้าอาหารแข็งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	30
รูปที่ 4.3 การแยกเชื้อด้วยเทคนิคการขีดไขว้ (cross streak) บนผิวหน้าอาหารแข็งบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	31
รูปที่ 4.4 การคัดเลือกยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeast) เบื้องต้น (primary screening) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรไนโตรเจนต่ำ (glucose 80 g/L, yeast extract 3.0 g/L, peptone 3.0 g/L, pH 5.0) ปริมาตรอาหาร 20mL ในฟลasks ขนาด 50mL บ่มแบบเขย่าที่ 30°C ที่ความเร็วรอบ 130 rpm เป็นเวลา 6 วัน.....	31
รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบปริมาณลิปิด (lipid content, %DCW) ของยีสต์ที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรไนโตรเจนต่ำ (low-nitrogen medium) บ่มแบบเขย่าที่ 30°C ที่ความเร็วรอบ 130 rpm เป็นเวลา 6 วัน.....	32
รูปที่ 4.6 รูปร่างของเซลล์ยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำและกลูโคสสูง (nitrogen-limiting medium) (a) และในอาหารสูตร YM broth ปกติ (b) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase-contrast กำลังขยาย 1000 เท่า.....	34

หน้า

รูปที่ 4.7 การเจริญในรูปน้ำหนักแห้ง (biomass, g/L) ปริมาณลิปิด (lipid, g/L) ปริมาณลิปิดโดยน้ำหนักแห้ง (Lipid content, %) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar, g/L) ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YK36.4 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm ที่ 30°C, 10 วัน.....	36
รูปที่ 4.8 การเจริญในรูปน้ำหนักแห้ง (biomass, g/L) ปริมาณลิปิด (lipid, g/L) ปริมาณลิปิดโดยน้ำหนักแห้ง (Lipid content, %) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar, g/L) ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm ที่ 30°C, 10 วัน.....	36
รูปที่ 4.9 การเจริญในรูปน้ำหนักแห้ง (biomass, g/L) ปริมาณลิปิด (lipid, g/L) ปริมาณลิปิดโดยน้ำหนักแห้ง (Lipid content, %) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar, g/L) ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU12.1 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm ที่ 30°C, 10 วัน.....	37
รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสะสมลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	38
รูปที่ 4.11 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	39
รูปที่ 4.12 ผลของปริมาณความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	40
รูปที่ 4.13 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ ปริมาณลิปิดและโปรตีนของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	42

หน้า

รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	44
รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 30g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	45
รูปที่ 4.16 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 40g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	45
รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 50g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	46
รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 60g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	46
รูปที่ 4.19 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 70g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	47
รูปที่ 4.20 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	47
รูปที่ 4.21 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 90g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	48

หน้า

- รูปที่ 4.22** ปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิปิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 100g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....48
- รูปที่ 4.23** เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง (biomass) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^{2+}) ที่ 15, 20, 25, 30, 40 mg/L บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....50
- รูปที่ 4.24** เปรียบเทียบปริมาณลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^{2+}) ที่ 15, 20, 25, 30, 40 mg/L บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....50
- รูปที่ 4.25** เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ MnCl_2 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....51
- รูปที่ 4.26** เปรียบเทียบการผลิตลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ MnCl_2 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน.....52
- รูปที่ 4.27** เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ ZnSO_4 (Zn^{2+}) ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....53
- รูปที่ 4.28** เปรียบเทียบปริมาณลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ ZnSO_4 (Zn^{2+}) ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....53
- รูปที่ 4.29** เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน.....55
- รูปที่ 4.30** เปรียบเทียบปริมาณลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน.....55

หน้า

รูปที่ 4.31 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ CuSO_4 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	56
รูปที่ 4.32 เปรียบเทียบปริมาณลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ CuSO_4 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	57
รูปที่ 4.33 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ FeSO_4 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	58
รูปที่ 4.34 เปรียบเทียบปริมาณลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ FeSO_4 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	58
รูปที่ 4.35 ปริมาณเซลล์ (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) และปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ ด้วยการหมักแบบกะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเริ่มต้น 80g/L บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 10 วัน.....	60
รูปที่ 4.36 ปริมาณเซลล์ (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) และปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ ด้วยการหมักแบบกะบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเริ่มต้น 30g/L และเติมสารละลายกลูโคสตามระยะต่างๆ ของการหมัก 30°C เป็นเวลา 10 วัน.....	61
รูปที่ 4.37 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ ปริมาณลิปิด และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ในระหว่างการเจริญของการเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะและกะบ่ม 30°C เป็นเวลา 10 วัน.....	61
รูปที่ 4.38 Phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene, showing position of the isolate YU5/2 with closely related species. The phylogenetic tree was constructed from the evolutionary distance data corrected by two-parameter transformation of Kimura (1980), using the neighbor-joining method. Numbers indicate percentages of bootstrap sampling, derived from 1000 samples.....	64
รูปที่ 4.39 Sequence alignment of the yeast isolate YU5/2 against D1/D2 of 26S rDNA sequence data of <i>Torulaspora globosa</i> showing no base substitutions.....	65

หน้า

รูปที่ 4.40 แสดงเซลล์แห้งของยีสต์ <i>Torulaspora globosa</i> YU5/2 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง.....	69
รูปที่ 4.41 การแยกชั้นของสารละลายในขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล.....	70
รูปที่ 4.42 แสดงน้ำมันยีสต์ <i>Torulaspora globosa</i> YU5/2 ในรูปของ FAME ที่ผลิตได้.....	70
รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS.....	83
รูปที่ ก-2 กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติกที่ใช้วัดปริมาณลิปิดตามวิธีการของ Know and Rhee.....	85
รูปที่ ก-3 กราฟมาตรฐานของ BSA สำหรับการวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการ Lowry method.....	87

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ลำดับการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซล (Lin et al., 2010).....	5
ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล (Huang et al., 2010).....	8
ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ	15
ตารางที่ 2.4 ยีสต์ไขมันสูงและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้สูงสุด (Ratledge and Tan, 1990).....	16
ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของลิปิดในยีสต์ไขมันสูงบางสายพันธุ์ (Ratledge and Tan, 1990)...	16
ตารางที่ 2.6 ชนิดของกรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์ต่างๆ (Ratledge and Tan, 1990).....	16
ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) และอัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate) ของยีสต์ที่คัดเลือกได้ บ่มที่ 30°C, 130 rpm, 6 วัน.....	32
ตารางที่ 4.2 แสดงการเจริญ (Biomass) การผลิตลิปิด อัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate) อัตราการผลิตมวลเซลล์ (volumetric cell mass production rate) ของยีสต์ไขมันสูงที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Lipid accumulation medium ที่ 30°C, 8 วัน	37
ตารางที่ 4.3 ผลของค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ (biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	38
ตารางที่ 4.4 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเซลล์แห้ง การผลิตลิปิด อัตราการผลิตลิปิด อัตราการผลิตมวลเซลล์ของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เวลา 8 วัน.....	40
ตารางที่ 4.5 ผลของปริมาณความเข้มข้นของ (NH ₄) ₂ SO ₄ ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	41

หน้า

ตารางที่ 4.6 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน (0.1g/L) ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	42
ตารางที่ 4.7 ผลของปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสต่อการเจริญ (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) อัตราการผลิตเซลล์ (Q_x) และอัตราการผลิตลิปิด (Lipid production rate) ของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน.....	49
ตารางที่ 4.8 ผลของ Ca^{2+} ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	51
ตารางที่ 4.9 ผลของ Mn^{2+} ต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	52
ตารางที่ 4.10 ผลของ Zn^{2+} ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	54
ตารางที่ 4.11 ผลของ Mg^{2+} ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	56
ตารางที่ 4.12 ผลของ Cu^{2+} ต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	57
ตารางที่ 4.13 ผลของ Fe^{2+} ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	59
ตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์แห้ง ปริมาณลิปิด ปริมาณน้ำตาลที่ใช้เพื่อการเจริญ อัตราการผลิตเซลล์ (Q_x) และอัตราการผลิตลิปิด (Lipid production rate) ของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะและแบบกะป้อน.....	62
ตารางที่ 4.15 ปริมาณกรดไขมันที่พบในลิปิดที่สกัดได้จากยีสต์ <i>Torulaspora globosa</i> YU5/2.....	67

หน้า

ตารางที่ ข-1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YK36/4 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน.....88

ตารางที่ ข-2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน.....88

ตารางที่ ข-3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU12/1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน.....89

ตารางที่ ข-4 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU12/1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารต่างกัน ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน.....89

ตารางที่ ข-5 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 วัน.....90

ตารางที่ ข-6 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....90

ตารางที่ ข-7 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 8 วัน.....90

หน้า

ตารางที่ ข-8 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....91

ตารางที่ ข-9 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....91

ตารางที่ ข-10 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....91

ตารางที่ ข-11 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....92

ตารางที่ ข-12 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....92

ตารางที่ ข-13 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 80g/ และมี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....92

ตารางที่ ข-14 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ยูเรีย (Urea) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....93

ตารางที่ ข-15 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....93

หน้า

ตารางที่ ข-16 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 20g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....94

ตารางที่ ข-17 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 30g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....94

ตารางที่ ข-18 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 40g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....95

ตารางที่ ข-19 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 50g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....95

ตารางที่ ข-20 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 60g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน95

ตารางที่ ข-21 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 70g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน96

ตารางที่ ข-22 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน96

หน้า

- ตารางที่ ข-23** ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 90g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....96
- ตารางที่ ข-24** ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 100g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C, 8 วัน97
- ตารางที่ ข-25** ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^{2+}) ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน97
- ตารางที่ ข-26** ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^{2+}) ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....97
- ตารางที่ ข-27** ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^{2+}) ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....98
- ตารางที่ ข-28** ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....98
- ตารางที่ ข-29** ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....99

หน้า

ตารางที่ ข-30 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และ ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่ม แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	99
ตารางที่ ข-31 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Zn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	100
ตารางที่ ข-32 ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Zn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่ม แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	100
ตารางที่ ข-33 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และ ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Zn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่ม แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	101
ตารางที่ ข-34 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mg^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	101
ตารางที่ ข-35 ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mg^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่ม แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	102
ตารางที่ ข-36 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และ ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mg^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่ม แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	102

หน้า

ตารางที่ ข-37	ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Cu^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	103
ตารางที่ ข-38	ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Cu^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	103
ตารางที่ ข-39	ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Cu^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	104
ตารางที่ ข-40	ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Fe^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	104
ตารางที่ ข-41	ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Fe^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	105
ตารางที่ ข-42	ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Fe^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน.....	105

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (List of Abbreviations)

คำย่อ	คำอธิบาย
DCW	Dry cell weight น้ำหนักเซลล์แห้ง
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
g/L/d	กรัมต่อลิตรต่อวัน
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร
rpm	รอบต่อนาที
Q_x	Volumetric cell mass production rate อัตราการผลิตเซลล์
°C	องศาเซลเซียส
%	ร้อยละ

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันความต้องการน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องจักร เครื่องยนต์ต่างๆ นับวันจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่น้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียมมีจำนวนจำกัดและนับวันจะลดลงเรื่อยๆ การมองหาน้ำมันและไขมันแหล่งใหม่ๆ มาใช้เป็นแหล่งพลังงานชีวภาพทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมจึงนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง นักวิจัยจึงพุ่งความสนใจไปที่น้ำมันชีวภาพ (bio-oil) ที่มีองค์ประกอบเป็นไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol, TAG) เพื่อใช้ผลิตเชื้อเพลิงเหลวไบโอดีเซลกันมากขึ้น โดยแหล่งของน้ำมันไตรกลีเซอไรด์ที่สำคัญที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันคือ น้ำมันจากเมล็ดพืช แต่การปลูกพืชน้ำมัน ต้องการพื้นที่สูง ภูมิอากาศที่เหมาะสมและใช้เวลาในการเพาะปลูกนาน การผลิตลิปิด หรือน้ำมันจากจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจอีกทางหนึ่ง จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิปิดได้สูงกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง เรียกว่าจุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganisms) ลิปิดหรือน้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เหล่านี้เรียกว่าไขมันเซลล์เดี่ยว (single cell oils) โดยองค์ประกอบของลิปิดประมาณร้อยละ 95 เป็นไตรกลีเซอไรด์ซึ่งมีสมบัติคล้ายน้ำมันจากเมล็ดพืช และเชื่อกันว่ามีศักยภาพสูงสำหรับการพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบกว่าการปลูกพืชน้ำมันหลายประการ เช่น เพาะเลี้ยงได้ตลอดปีไม่ขึ้นกับฤดูกาลและสภาพดินฟ้าอากาศ เจริญเร็วทำให้ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้น ใช้พื้นที่น้อย สามารถควบคุมการผลิตและใช้วัตถุดิบราคาถูกได้หลากหลายชนิด โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีข้อดีแตกต่างกันในการนำมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพ

การผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ในปัจจุบันเพื่อการค้าส่วนใหญ่จะมุ่งไปที่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยาและเครื่องสำอาง ซึ่งน้ำมันที่ผลิตได้จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์และปลอดภัยสูง ในขณะที่การนำไปใช้ผลิตไบโอดีเซลไม่ต้องการคุณสมบัติดังกล่าว ปัจจุบันงานวิจัยการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ศึกษาในสเกลขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากมีการผลิตและสะสมลิปิดภายในเซลล์ได้สูงถึงร้อยละ 60-70 และองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ส่วนใหญ่

ประกอบด้วยกรดปาลมิติก (palmitic acid) กรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดสเตียริก (stearic acid) ซึ่งมีความคล้ายกับน้ำมันจากเมล็ดพืช ข้อได้เปรียบของยีสต์ในด้านการเพาะเลี้ยง คือ เจริญเร็ว สามารถใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกได้และเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายโดยการปั่นเหวี่ยง ส่วนรามีการสะสมลิปิดสูงเช่นเดียวกัน แต่เจริญช้ากว่ายีสต์และการขยายขนาดเพาะเลี้ยงเชื้อราในระดับใหญ่จะยุ่งยากมากกว่า จากคุณสมบัติของยีสต์ดังกล่าวมา คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตน้ำมันชีวภาพหรือลิปิดจากยีสต์พื้นถิ่น ซึ่งรายงานการวิจัยการผลิตลิปิดจากยีสต์ส่วนใหญ่นั้นใช้ยีสต์ที่คัดเลือกและเก็บรักษาในหน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์ยีสต์ในต่างประเทศ ส่วนรายงานการคัดเลือกและเก็บรักษายีสต์พื้นถิ่นในไทยที่มีการสะสมลิปิดยังมีไม่มากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นคัดเลือกยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูงจากดินบริเวณต่างๆ ในพื้นที่เขตจังหวัดขอนแก่น อุดรธานี กาฬสินธุ์และนครราชสีมา จากนั้นศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตลิปิดจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ เพื่อนำไปศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตน้ำมันชีวภาพ เพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อผลิตลิปิดหรือน้ำมันจากยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูงสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล โดยงานวิจัยนี้มุ่งแยกและคัดเลือกยีสต์จากตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ โดยแบ่งเป็นหัวข้อดังนี้

1.2.1 แยกและคัดเลือกยีสต์พื้นถิ่นที่มีศักยภาพในการผลิตและสะสมลิปิดภายในเซลล์

1.2.2 ศึกษาสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ลิปิดสูงในระดับฟลasks

1.2.3 ศึกษาการผลิตลิปิดจากยีสต์ด้วยการหมักแบบกะและแบบกะป้อนในถังหมัก

1.2.4 ศึกษาองค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันและลิปิดที่สะสมในเซลล์ยีสต์ และศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันยีสต์และ/หรือเซลล์แห้งด้วยวิธีทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกและคัดเลือกยีสต์พื้นถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตและสะสมลิปิดจากตัวอย่างดิน ในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่น อุดรธานี กาฬสินธุ์ และนครราชสีมา โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์และแบ่งเอกลักษณ์ของยีสต์พื้นถิ่นลิปิดสูงไอโซเลทนั้นๆ ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการผลิตและสะสมลิปิดของยีสต์ลิปิดสูงที่คัดเลือกได้รวมถึงชนิดและปริมาณ

ของกรดไขมันที่ผลิตได้ที่สภาวะต่างๆ ศึกษาเปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยการหมักแบบกะและแบบกะบ้อน ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันยีสต์และจากเซลล์แห้งโดยวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในระดับห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชและมาตรฐานไบโอดีเซลตามมาตรฐานของกรมธุรกิจพลังงาน พ.ศ. 2550

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ข้อมูลจากการวิจัยที่ได้จะนำไปใช้ในการเรียนการสอนวิชา 317 438 เชื้อเพลิงชีวภาพจากจุลินทรีย์ (Microbial Biofuel) 317 439 ปฏิบัติการเชื้อเพลิงชีวภาพจากจุลินทรีย์ (Microbial Biofuel Laboratory) และการวิจัยเพื่อเพิ่มศักยภาพในการวิจัยและพัฒนากระบวนการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับนักศึกษาทั้งระดับปริญญาตรีและบัณฑิตศึกษาของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.4.2 ได้องค์ความรู้ใหม่ในการผลิตน้ำมันยีสต์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ (microbial oils) สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกใหม่ในการผลิตไบโอดีเซล

1.4.3 เผยแพร่ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยโดยการส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ และแสดงผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

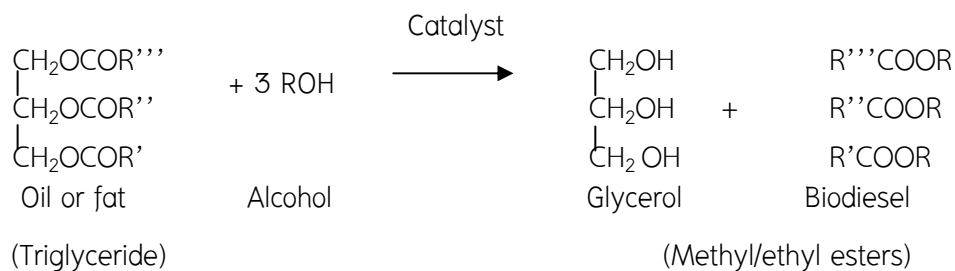
บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อเพลิงชีวภาพไบโอดีเซล

จากสถานการณ์ความไม่แน่นอนของราคาและปริมาณน้ำมันดิบรวมทั้งปัญหาภาวะโลกร้อน ทำให้ประเทศต่างๆ มีความตื่นตัวในเรื่องของพลังงานโดยได้เร่งศึกษาวิจัยเพื่อหาแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม อาทิเช่น พลังงานแสงอาทิตย์ (solar energy) พลังงานชีวมวล (biomass) และแก๊สชีวภาพ (biogas) เป็นต้น และที่ได้รับความสนใจมากที่สุดอย่างหนึ่งในตอนนี้เห็นจะเป็นไบโอดีเซลหรือดีเซลชีวภาพ (biodiesel) ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกที่มีคุณสมบัติในการเผาไหม้เหมือนกับดีเซลและไม่มีการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่บรรยากาศจึงเป็นเชื้อเพลิงที่ดีในการช่วยบรรเทาภาวะโลกร้อน (Lang et al., 2001; Antolin et al., 2002)

ไบโอดีเซล หมายถึง เชื้อเพลิงเหลวที่ผลิตจากไขมันสัตว์ น้ำมันจากเมล็ดพืช นำมาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยการเติมแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล และมีตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟูริกภายใต้ภาวะอุณหภูมิสูงเพื่อเปลี่ยนไขมันให้เป็นไบโอดีเซลชนิดเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl ester: FAME) หรือเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid ethyl ester: FAEE) ขึ้นอยู่กับประเภทของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตและมีกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) เป็นผลพลอยได้ นอกจากนั้นยังมีการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล กระบวนการหรือปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Fukuda et al., 2001)

2.1.1 ความเป็นมาของไบโอดีเซล

เครื่องยนต์ดีเซลได้ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2440 (ค.ศ. 1897) โดยวิศวกรที่ชื่อว่า รูดอล์ฟ ดีเซล (Rudolf Christian Karl Diesel : 1858–1913) และดีเซลเป็นผู้ที่ริเริ่มคิดค้นไบโอดีเซลคนแรกและได้นำเสนอเครื่องยนต์ที่เดินเครื่องด้วยไบโอดีเซลครั้งแรกที่ประเทศเยอรมันเมื่อวันที่ 10 สิงหาคม ค.ศ.1893 โดยนำมาทดลองใช้ในเครื่องยนต์เป็นผลสำเร็จครั้งแรกของโลกและเพื่อเป็นการระลึกถึงความสำเร็จในครั้งนั้นจึงมีการกำหนดให้วันที่ 10 สิงหาคมเป็นวันไบโอดีเซลระหว่างประเทศ การนำน้ำมันจากพืชมาใช้ในการเครื่องยนต์ดีเซลเป็นครั้งแรกเกิดขึ้นในปี พ.ศ. 2455 (ค.ศ. 1912) เมื่อใช้ไประยะหนึ่งก็ต้องหยุดไปเนื่องจากมีการค้นพบวิธีการผลิตน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมที่มีราคาถูกกว่า จนกระทั่งปี พ.ศ. 2513 (ค.ศ. 1970) เกิดวิกฤติราคาน้ำมันขึ้นทำให้พลังงานเชื้อเพลิงจากพืชได้รับความสนใจอีกครั้งหนึ่ง (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ลำดับการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซล (Lin et al., 2010)

ปี ค.ศ.	เหตุการณ์
1893	รูดอล์ฟ ดีเซล (Rudolf Diesel) ผลิตเครื่องยนต์ดีเซลเป็นคนแรกและใช้น้ำมันถั่วลิสงเดินเครื่องยนต์ครั้งแรกที่เมือง Augsburg เยอรมนี
1910	รูดอล์ฟ แสดงเครื่องยนต์ดีเซลในงานมหกรรมโลกที่ปารีส เครื่องยนต์ใช้น้ำมันถั่วลิสง 100%
1977	Expedito Parente นักวิทยาศาสตร์ชาวบราซิล จดสิทธิบัตรการผลิตไบโอดีเซลเป็นครั้งแรก
1979	เริ่มวิจัยการใช้น้ำมันเมล็ดทานตะวันแปรรูปสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลในแอฟริกาใต้
1983	กระบวนการสมบูรณ์เพื่อผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลและทดสอบใช้และตีพิมพ์นานาชาติ
1987	บริษัท Gaskoks ของออสเตรเลีย ตั้งโรงงานต้นแบบเพื่อผลิตไบโอดีเซลเป็นครั้งแรก
1989	บริษัท Gaskoks ของออสเตรเลีย ตั้งโรงงานผลิตไบโอดีเซลระดับอุตสาหกรรมเป็นครั้งแรก
1991	จัดทำมาตรฐานไบโอดีเซลเป็นครั้งแรกที่ออสเตรเลีย
1997	จัดทำมาตรฐานไบโอดีเซลของเยอรมัน (German standard) DIN 51606
2002	จัดทำมาตรฐานไบโอดีเซล ASTM D6751 เป็นครั้งแรก
2003	จัดทำมาตรฐานไบโอดีเซลของยุโรป (Europe-wide biodiesel): DIN EN14214
2005	มลรัฐออริโซนา สหรัฐอเมริกา มีการผสมไบโอดีเซลอย่างต่ำ 2% ในดีเซลเป็นครั้งแรก
2008	กำหนดมาตรฐานใหม่ของไบโอดีเซล ASTM Biodiesel Blend Specifications Standards
2008	กำหนดมาตรฐานไบโอดีเซล European Standard EN14212 และใช้แทนมาตรฐานปี 2003 (EN14212:2003)

ไบโอดีเซลมีจุดเริ่มต้นมาจากประเทศในแถบยุโรปมีการทดลองกระบวนการ Transesterification ในปี พ.ศ. 2525 โดยใช้น้ำมันจากเมล็ดแฟลพ (rapeseed oil) ณ สถาบัน Institute of Organic Chemistry เมือง Graz ประเทศออสเตรีย (Austria) ปัจจุบันในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา มีการผลิตและจำหน่ายอย่างกว้างขวางโดยได้รับการยอมรับจาก บริษัทผู้ผลิตรถยนต์และผู้ค้าน้ำมันโดยผสมไบโอดีเซลในสัดส่วนร้อยละ 2 (หรือ B2 โดยผสมไบโอดีเซล ส่วนในน้ำมันดีเซล 98 ส่วน) ซึ่งบังคับใช้ในมลรัฐมินิโซต้าและ 20% (B20) ตามคำแนะนำให้ใช้ได้ตามกฎหมายยานยนต์เชื้อเพลิงทดแทนของสหรัฐอเมริกา หลายๆ ประเทศมีการศึกษาและพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลอย่างต่อเนื่องและในรอบ 10 ปีที่ผ่านมาประเทศที่ผลิตไบโอดีเซลเป็นอุตสาหกรรมมากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ เยอรมนี ฝรั่งเศส อิตาลี สหรัฐอเมริกาและออสเตรีย

2.1.2 วัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

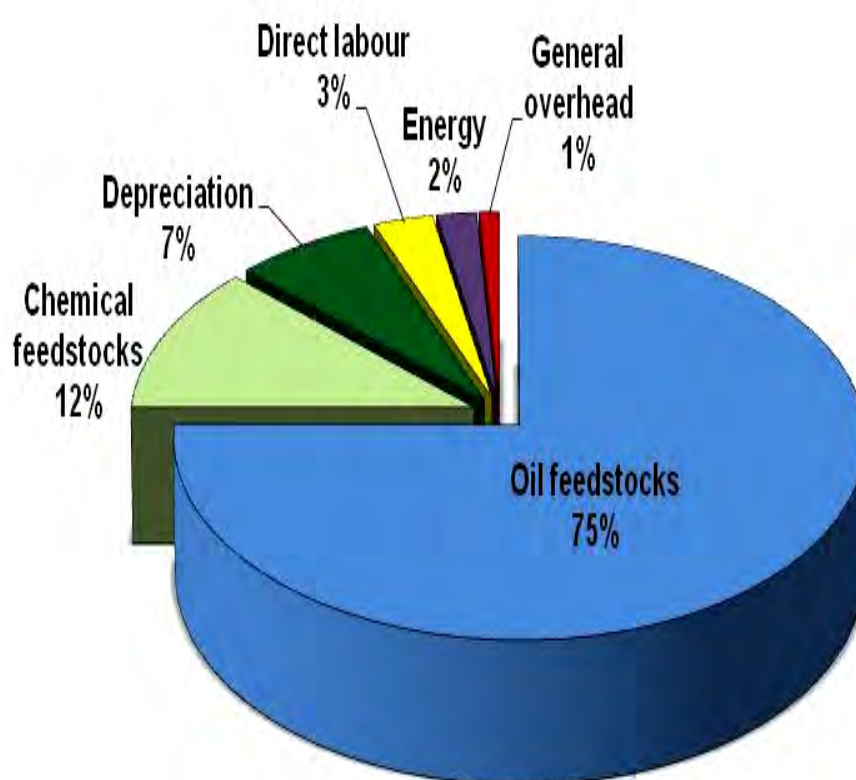
วัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันได้แก่ น้ำมันพืช ไขมันสัตว์และน้ำมันสัตว์ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกใช้วัตถุดิบ คือ ราคา ปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันพืชชนิดนั้น ๆ รวมทั้งความเหมาะสมของปริมาณการปลูกพืชน้ำมันในพื้นที่นั้นด้วย เช่น ปาล์มน้ำมันและมะพร้าวเป็นพืชน้ำมันที่ปลูกมากในประเทศไทย ถั่วเหลืองปลูกมากในสหรัฐอเมริกา แรพและทานตะวันปลูกมากในกลุ่มประเทศยุโรป ประเทศไทยมีการปลูกพืชน้ำมันหลัก 6 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว ถั่วลิสง งา และละหุ่ง โดยปาล์มน้ำมันปลูกมากที่สุด รองลงมาคือ มะพร้าว นอกจากนั้นยังมี สบู่ดำ น้ำมันสัตว์และน้ำมันพืชใช้แล้ว วัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลในไทยในปัจจุบัน คือ ปาล์มน้ำมัน สบู่ดำ และน้ำมันพืชใช้แล้ว ประเทศสหรัฐอเมริกา นิยมใช้น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันใช้แล้ว (waste cooking oil) เป็นวัตถุดิบ

ไบโอดีเซลส่วนใหญ่ผลิตจากน้ำมันพืช เช่น น้ำมันเมล็ดแฟลพ (rapeseed oil) ใช้ผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด (59%) รองลงมาเป็นน้ำมันถั่วเหลือง (25%) และน้ำมันปาล์ม (10%) น้ำมันพืชอื่นๆ เช่น น้ำมันเมล็ดทานตะวัน (Pohl, 2008) ไบโอดีเซลมีคุณสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซลและใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้ จำนวนคาร์บอนในดีเซลประมาณ 15 อะตอมส่วนน้ำมันพืชมีคาร์บอน 14-18 อะตอม อย่างไรก็ตามราคาไบโอดีเซลยังสูงกว่าดีเซลประมาณ 2 เท่า ต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลมาจากวัตถุดิบน้ำมันพืชและกระบวนการผลิต ราคาวัตถุดิบประมาณ 60-75% ของต้นทุนรวมทั้งหมด ถึงแม้จะใช้น้ำมันพืชใช้แล้ว (รูปที่ 2.2) ปัญหาหนึ่งของการใช้น้ำมันพืชใช้แล้วคือกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) มีปริมาณสูงทำให้ยากต่อการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Haas, 2005) ดังนั้นการเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมจึงลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลได้

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลสามารถแบ่งได้เป็นรุ่นที่หนึ่ง (first generation biodiesel feedstocks) เป็นวัตถุดิบกลุ่มแรกที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เมล็ดแรพ น้ำมันปาล์ม โดยมากกว่า 95% เป็นน้ำมันบริโภคได้ (edible oil) ทำให้เกิดปัญหาด้านราคาและปริมาณสำรองของพืชอาหาร

วัตถุดิบรุ่นที่สอง (second generation biodiesel feedstocks) เป็นกลุ่มน้ำมันที่บริโภคไม่ได้ (non-edible oil) หรือไม่ใช่พืชอาหาร (non-food feedstocks) เช่น สนุ่นดำ (jatropha) น้ำมันโจโจบา (jojoba oil) น้ำมันพืชใช้แล้วก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ข้อดีของวัตถุดิบกลุ่มนี้ คือ ลดการแข่งขันกับพืชอาหาร ปลูกร่วมกับพืชอื่นได้และปลูกในที่ดินที่ปลูกพืชอาหารไม่ได้

วัตถุดิบรุ่นที่สาม (Third generation biodiesel feedstocks) เป็นกลุ่มน้ำมันจากจุลินทรีย์ (microbial oil) ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ไขมันสูงหรือกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตน้ำมันได้สูง (oleaginous microorganisms) เช่น ยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeast) และสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เป็นทางเลือกที่ดีในการแก้ปัญหาของวัตถุดิบรุ่นที่หนึ่งและสอง



รูปที่ 2.2 ต้นทุนทั่วไปในการผลิตไบโอดีเซล (ดัดแปลงจาก Lim and Teong, 2010)

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบข้อดีและข้อด้อยของวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล (Huang et al., 2010)

แหล่งน้ำมัน	ข้อดี	ข้อด้อย
น้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal oils)	1) มีกรดไขมันที่เหมือนกับน้ำมันพืช 2) เมื่อสภาวะเพาะเลี้ยงเหมาะสมจะสะสมน้ำมันสูง 85% ของน้ำหนักแห้ง 3) ระยะเวลาเพาะเลี้ยงสั้น	1) ลิปิดจากสาหร่ายส่วนใหญ่ค่าพลังงานต่ำกว่าเชื้อเพลิงดีเซล 2) ต้นทุนเพาะเลี้ยงสูงเมื่อเทียบกับพืชน้ำมัน
น้ำมันยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeast oils)	1) มีหลายสายพันธุ์ในธรรมชาติ 2) ปริมาณน้ำมันในเซลล์สูง 3) ระยะเวลาเพาะเลี้ยงสั้น	1) วิธีสกัดน้ำมันยุ่งยากมากกว่าและต้องพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ 2) ต้นทุนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมัน
น้ำมันพืชใช้แล้ว	1) ราคาถูกเมื่อเทียบกับพืชน้ำมัน	1) FFA สูงซึ่งเป็นปัญหาในการผลิตไบโอดีเซล

2.2 การผลิตลิปิดในจุลินทรีย์ไขมันสูง

2.2.1 กลไกการผลิตลิปิดในจุลินทรีย์

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตลิปิดหรือไขมันและน้ำมันจากจุลินทรีย์กันอย่างแพร่หลายและพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิปิดได้นั้นมีทั้งแบคทีเรีย รา ยีสต์และสาหร่ายขนาดเล็ก โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีข้อดีแตกต่างกันในการที่จะนำมาผลิตไขมันเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ ลิปิดที่ได้จากจุลินทรีย์จะเรียกว่าไขมันเซลล์เดี่ยวหรือน้ำมันเซลล์เดี่ยว (single cell oils: SCOs) ซึ่งมักเป็นน้ำมันที่บริโภคได้ (edible oil) มีองค์ประกอบคล้ายน้ำมันจากเมล็ดพืช โดยองค์ประกอบหลักคือไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol : TAG) ซึ่งจะอยู่ในรูปหยดน้ำมันเล็กๆ (microdroplet oil) ภายในเซลล์ จุลินทรีย์ที่ผลิตไขมันได้เรียกว่าเป็นจุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganisms) โดยลิปิดที่ผลิตได้ต้องมีปริมาณ 20% โดยน้ำหนักแห้งขึ้นไป ส่วนจุลินทรีย์ที่สะสมลิปิดภายในเซลล์น้อยกว่า 20% โดยน้ำหนักแห้ง เรียกว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง (non-oleaginous microorganisms) การผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์เริ่มต้นตั้งแต่ ค.ศ. 1980 เพื่อใช้ทดแทนน้ำมัน cocoa butter ที่มีการผลิตในปริมาณต่ำแต่ความต้องการสูง โดยยีสต์ *Rhodospirium toruloides* และ *Cryptococcus curvatus* ซึ่งผลิตกรด

ไขมันที่มีสมบัติคล้ายกับกรดไขมันใน cocoa butter คือ เป็นกลุ่มไตรกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยสเตียเรท (stearate) โอลิเอท (oleate) และปาลมิเตท (palmitate) (Ratledge, 1981; Ratledge, 1991; Ratledge, 2004)

ลิพิด (lipids) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไม่มีขั้ว (non-polar) เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform) อีเทอร์ (ether) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) เบนซีน (benzene) และเฮกเซน (hexane) เป็นต้น และชนิดที่มีขั้วน้อย เช่น แอลกอฮอล์ อะซีโตน เป็นต้น โมเลกุลของลิพิดจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีลักษณะไม่มีขั้วมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) อยู่ในโครงสร้าง ลิพิดบางชนิดจะมีหมู่ที่มีขั้วซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilicity) ต่อกับส่วนไม่มีขั้ว ทำให้สมบัติลิพิดนั้นมีลักษณะเป็นแอมฟิฟิลล์ (amphiphile or amphipathic molecule) ลิพิดทำหน้าที่ที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต เช่น เป็นโครงสร้างของเมมเบรนชนิดต่างๆ เป็นแหล่งพลังงาน และหน้าที่เฉพาะอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ ปัจจุบันมีการจำแนกชนิดของลิพิดออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ (ด๊วง, 2534; ประหยัด, 2537) คือ

1) ลิพิดธรรมดา (simple lipids) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไขมัน (fats) และไข (waxes) ไขมันเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอลเมื่อเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องเรียกว่าน้ำมัน (oils) ส่วนไขเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับ monohydric alcohol

2) ลิพิดเชิงประกอบ (compound lipids) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และมีสารอื่นๆ รวมอยู่ด้วย ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ไกลโคลิพิด (glycolipids)

3) อนุพันธ์ลิพิด (derived lipids) เป็นสารประกอบที่ได้จากการเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของลิพิดธรรมดาและลิพิดเชิงประกอบ ได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ สเตียรอยด์ คลอเลสเทอรอล คาร์ทีนอยด์ เป็นต้น

การสะสมลิพิดในจุลินทรีย์ต้องเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนเกินพอและจำกัดปริมาณไนโตรเจน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมลิพิดจำนวนมากๆ ในเซลล์ต้องสามารถเข้าสู่การสังเคราะห์ลิพิดได้ทันที โดยจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ลิพิดต้องมีสมบัติดังนี้ มีความสามารถในการผลิต Acetyl-CoA ได้อย่างต่อเนื่องภายในเซลล์ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน และมีความสามารถในการผลิต NADPH มากเพียงพอเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน การสังเคราะห์ acetyl-CoA ในจุลินทรีย์ไขมันสูงจะเกิดขึ้นเมื่อมีเอนไซม์ ATP:citrate lyase (ACL) ซึ่งจะไม่พบในจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง (Ratledge, 1981; Ratledge, 2004) ดังสมการที่ (1)



เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจะต้องมีการดซิทริค (citric acid) ในปริมาณที่เพียงพอซึ่งกรดดังกล่าวผลิตได้จากวัฏจักรไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle : TCA) ซึ่งเกิดขึ้นภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ โดยคุณสมบัติประการหนึ่งที่สำคัญของจุลินทรีย์ไขมันสูงคือสามารถสะสมกรดซิทริกภายในเซลล์ได้ดีเนื่องจากถูกควบคุมโดยกิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase เมื่อมี AMP (adenosine monophosphate) เกิดขึ้นใน TCA cycle โดยปริมาณความเข้มข้นของ AMP จะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ AMP deaminase (Ratledge, 1991; Ratledge, 2004) ดังสมการที่ (2)



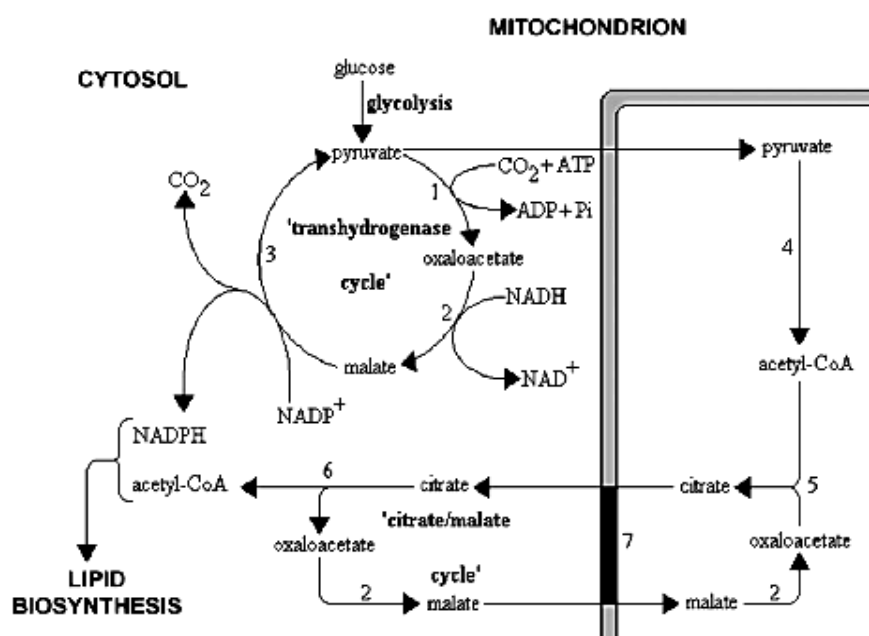
การสังเคราะห์ลิปิดของจุลินทรีย์จะเกิดได้ดีเมื่อมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะส่งผลเสริมการสร้าง acetyl-CoA เมื่อปริมาณไนโตรเจนจำกัดเซลล์จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ AMP deaminase เพิ่มขึ้นเป็น 5 เท่าของการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีการจำกัดไนโตรเจน การเพิ่มกิจกรรมของ AMP deaminase จะลดการสะสมของ AMP ภายในเซลล์และในไมโทคอนเดรีย การลดลงของ AMP ในไมโทคอนเดรียจะไปกระตุ้นหรือหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นกับปริมาณของ AMP ผลที่ได้คือ isocitrate จะไม่ถูกเปลี่ยนแต่จะสะสมภายในไมโทคอนเดรียในรูปของ citrate จากนั้น citrate จะถูกส่งไปสู่ออร์แกเนลล์ไซโตพลาสซึม (cytosol) จากนั้นถูกสลายด้วยเอนไซม์ ATP:citrate lyase (ACL) ได้เป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate จากนั้น acetyl-CoA จะถูกนำไปสังเคราะห์กรดไขมัน ส่วน oxaloacetate จะถูกเปลี่ยนไปเป็น malate โดยเอนไซม์ malate dehydrogenase จากนั้นจะถูกส่งเข้าไปในไมโทคอนเดรีย เพื่อทำหน้าที่ในการส่ง citrate จากไมโทคอนเดรียออกสู่ออร์แกเนลล์ไซโตพลาสซึม (Ratledge, 2004) ดังรูปที่ 2.3

การสังเคราะห์กรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอมจำนวน 1 โมลต้องการ NADPH จำนวน 16 โมล แหล่งของ NADPH สำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันที่สำคัญคือเอนไซม์ malic ดังสมการที่ (3)



เอนไซม์ malic พบมากในจุลินทรีย์ไขมันสูง ซึ่งจะทำให้เกิด metabolon complex โดยประกอบด้วย ACL และ fatty acid synthase (FAS) เพื่อทำหน้าที่เปลี่ยน acetyl-CoA เป็นกรด

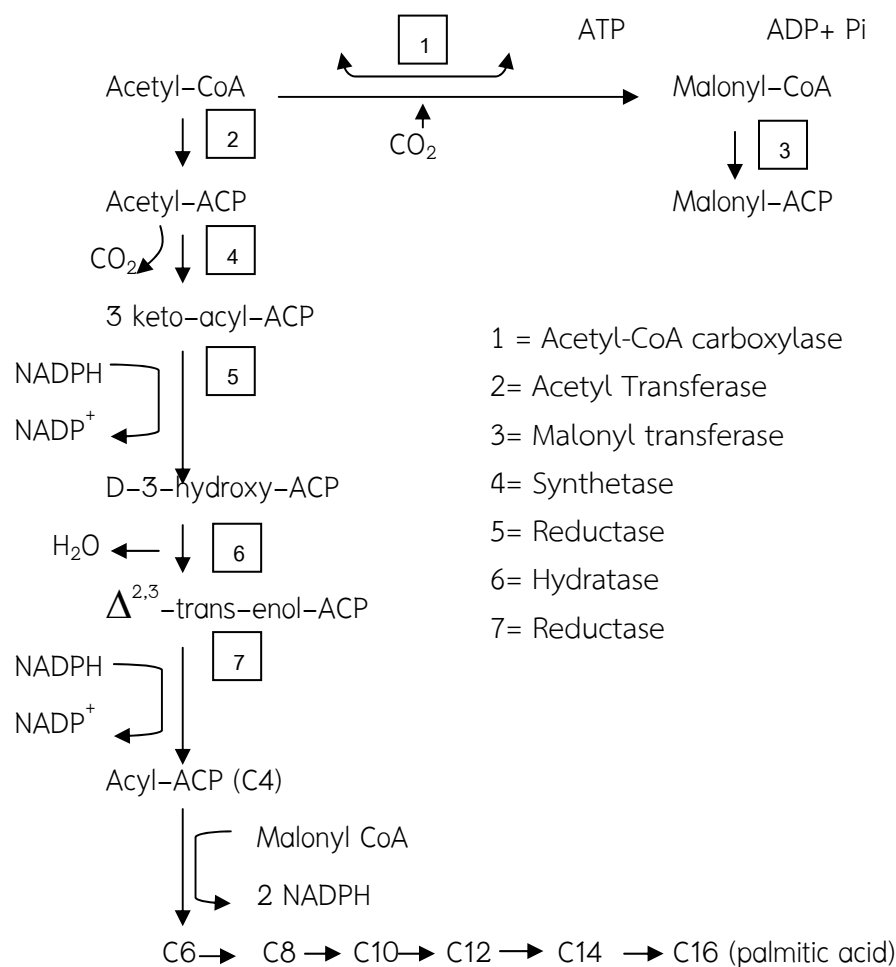
ไขมันและจากนั้นกรดไขมันจะรวมกับกลีเซอรอลได้เป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลและสะสมในเมมเบรนของ endoplasmic reticulum ในรูปของ fatty acid droplets (C16 :0) จากนั้นมีการเพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมและเพิ่มพันธะคู่ได้เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวอย่างยิ่งยวดสายยาว (long chain polyunsaturated fatty acids: LCPUFAs) (Ratledge, 2004) การสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์จะเริ่มจากการสังเคราะห์กรดปาล์มิติก (C16:0) จาก acetyl-CoA และ NADPH โดยเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม ส่วน acetyl-CoA ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียจะถูกส่งออกมาที่ไซโตพลาสซึมโดยอาศัย citrate จากนั้นเข้าสู่การสังเคราะห์กรดไขมันในไซโตพลาสซึมโดยการควบคุมของเอนไซม์ fatty acid synthase เริ่มจาก acetyl-CoA ทำปฏิกิริยากับ CO₂ ได้เป็น malonyl CoA โดยใช้พลังงานจาก ATP จากนั้น acetyl-CoA และ malonyl-CoA จะทำปฏิกิริยากับ Acyl carrier protein (ACP) ได้เป็น acetyl-ACP และ malonyl-ACP ซึ่งจะรวมกันได้ Acyl ACP (C4) และใช้ NADPH 2 โมเลกุล จากนั้นปฏิกิริยาจะดำเนินซ้ำแบบเดิมจำนวน 4 ขั้นตอน จนได้กรดปาล์มิติก (Ratledge and Evans, 1989 ; Ratledge, 1991; Ratledge, 2004 ; Tehlivets et al., 2007) ดังรูปที่ 2.4



Net carbon balance: pyruvate $\longrightarrow$ acetyl-CoA + CO₂

Net reaction for NADPH production: NADP + NADP⁺ + ATP $\longrightarrow$ NAD⁺ + NADPH + P_i

รูปที่ 2.3 แสดงการวัฏจักรของ citrate/malate cycle ในจุลินทรีย์ไขมันสูง, Enzymes : 1, pyruvate decarboxylase; 2, malate dehydrogenase; 3, malic enzyme; 4, pyruvate dehydrogenase; 5, citrate synthase; 6, ATP:citrate lyase; 7, citrate/malate translocase. (Ratledge, 2004)



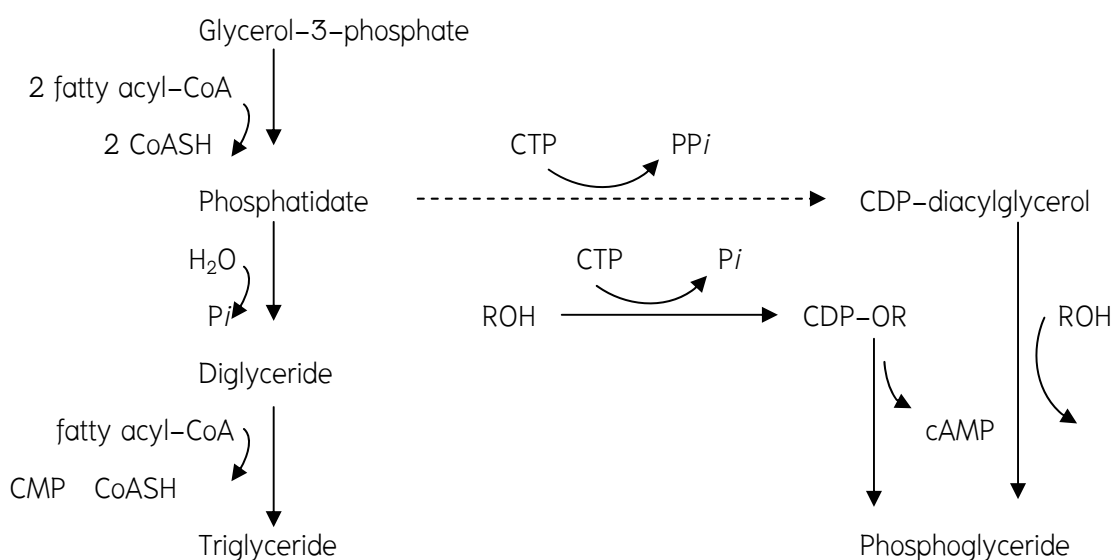
รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์กรดไขมันปาล์มิติกในไซโตพลาสซึม

ที่มา ดัดแปลงจาก Ratledge and Evans, 1989

กรดไขมันที่สิ่งมีชีวิตสังเคราะห์ขึ้นมาส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคาร์บอน 16 หรือ 18 อะตอม จากนั้นกรดไขมันเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเอนไซม์ desaturases และ elongases การเพิ่มพันธะคู่ในกรดไขมันจะเริ่มจาก palmitoyl-CoA (palmitic acid, C16 :0) เปลี่ยนเป็น stearoyl-CoA (C18 :0) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น oleoyl-CoA (oleic acid, C18 :1) การเพิ่มพันธะคู่ในกรดไขมันจะมีปฏิกิริยา chain elongation โดยเอนไซม์ elongase ทำหน้าที่เพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมและ desaturation โดยเอนไซม์ desaturase ทำหน้าที่ในการเพิ่มหรือเติมพันธะคู่ ตามลำดับ จากนั้นกระบวนการก็จะดำเนินการในการเพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมและพันธะคู่ไปเรื่อยๆ จนได้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (LCPUFAs) การสร้างพันธะคู่ในกรดไขมันโดยการใช้ออกซิเจนและอาศัย electron transport system เรียกระบบนี้ว่า microsomal desaturase system เช่น palmitoyl-CoA (C16:0) เปลี่ยนเป็น palmitoleyl-CoA (C16:1) โดยอาศัยออกซิเจนและ NADPH โดยปฏิกิริยานี้เกิดใน endoplasmic reticulum ยีสต์มี

แนวโน้มในการผลิตเพียง mono-unsaturated fatty acid และ di-unsaturated fatty acid ของ C16 และ C18 (Ratledge and Evans, 1989; Ratledge, 2004)

กรดไขมันที่สังเคราะห์ได้ในจุลินทรีย์จะเก็บสะสมในรูปของไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์ เนื่องจากกรดไขมันละลายน้ำได้ยากและจะอยู่ในรูปไมเซลล์ (micelle) อีกทั้งคุณสมบัติของการเป็นกรดและเป็น oxidizing agent ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ จึงสร้างพันธะเอสเทอร์กับสารประกอบอื่นๆ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลีเซอรอล ได้เป็นกลีเซอไรด์ โดย fatty acyl-CoA รวมตัวกับ glycerol-3-phosphate เกิดเป็น phosphatidate เมื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกไปจะได้กลีเซอไรด์ซึ่งสามารถรวมตัวกับสารอื่น เช่น โคลีน (choline) ซีรีน (serine) และอินซิทอล (inositol) กลายเป็นฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) แต่การรวมตัวกันนั้น phosphatidate จะถูกเปลี่ยนไปเป็นรูป active form ในรูปอนุพันธ์ของ cytidine diphosphate (CDP) คือ CDP-diacylglycerol แล้วจึงรวมกับสารอื่นๆ (Ratledge and Evans, 1989; Ratledge, 2004) ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์

ที่มา ดัดแปลงจาก Ratledge and Evans (1989)

2.2.2 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตน้ำมันชีวภาพ

คุณสมบัติโดยทั่วไปของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมไม่แตกต่างจากจุลินทรีย์ที่ผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ ในระดับอุตสาหกรรม กล่าวคือ จุลินทรีย์ต้องมีความเสถียรทางพันธุกรรมนั่นคือให้ผลิตภัณฑ์คงที่เมื่อใช้ผลิตสารนั้นๆ เป็นเวลานานๆ จุลินทรีย์ต้องไม่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic microorganisms) หรือผลิตสารพิษซึ่งทั้งสองลักษณะต้องปลอดภัยต่อผู้ทำงานในโรงงานที่ผลิตและปลอดภัยต่อการนำไปเป็นส่วนประกอบ

ของอาหารคน อาหารสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ฯ สำหรับการหมักแบบต้องการอากาศ (aerobic fermentation) จุลินทรีย์นั้นต้องมีความทนต่อแรงเฉือนจากการกวน การให้อากาศและการผสมผสาน จุลินทรีย์ต้องมีอัตราการเจริญสูงและให้ผลิตภัณฑ์สูง และคุณสมบัติที่พึงประสงค์อย่างยิ่งของจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาผลิตน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมมีดังนี้ มีความสามารถในการสะสมลิปิดในปริมาณสูง สามารถเจริญแบบ heterotrophic growth กรณีที่จุลินทรีย์นั้นคัดแยกมาจากน้ำทะเลต้องสามารถเจริญได้ดีในที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างๆ สามารถเจริญและให้ผลผลิตได้ในที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 30 °C ผลิตและสะสมลิปิดเป็นส่วนประกอบหลัก และลิปิดที่ได้ต้องอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์และน้ำมันที่ผลิตได้ต้องสามารถสกัดออกจากเซลล์ได้ง่าย (Ratledge, 2004)

2.2.3 ลิปิดที่พบในยีสต์

ยีสต์ (yeast) คือ รากลุ่มหนึ่งที่มีส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาว ผลั้ว เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อ พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ในน้ำ ในส่วนต่างๆของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลงและในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่ยีสต์อยู่บ่อยๆคือแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมักจะปนลงไปในการเป็นเหตุให้อาหารเน่าเสียได้ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต ยีสต์มีการใช้ในอุตสาหกรรมมานาน เช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) ใช้ในการผลิตขนมปัง การผลิตแอลกอฮอล์ผ่านกระบวนการหมัก เป็นต้น สำหรับยีสต์หลายสายพันธุ์พบว่าการสะสมลิปิดภายในเซลล์ได้ในปริมาณสูงถึง 60-70 % และข้อได้เปรียบของยีสต์คือสามารถเจริญได้เร็วและเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายโดยการปั่นเหวี่ยง ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงและมีการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ตัวอย่างยีสต์ไขมันสูง เช่น *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus* sp., *Rhodotulura* sp. และนอกจากนั้นน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์มีคุณสมบัติของ triacylglycerol fraction คล้ายกับน้ำมันพืชโดยเฉพาะน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus curvatus* (*Candida curvata* D) (Meesters et al., 1996; Gill et al., 1997; Li et al., 2007)

กรดไขมันที่ผลิตโดยยีสต์ส่วนใหญ่เป็น C16 และ C18 โดยสะสมอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) หรือไตรเอซิลกลีเซอไรด์ (triacylglyceride) นอกนั้นจะอยู่ในรูปฟอสโฟลิปิด (phospholipids) สเตอรอล (sterol) และเอสเทอร์ของสเตอรอล (sterol ester) ซึ่งโดยทั่วไปจะเห็นว่าลิปิดที่ได้จากยีสต์เหล่านี้มีองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายกับน้ำมันพืช ดังตารางที่ 2.3 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเอาน้ำมันจากยีสต์มาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนอีกแหล่งหนึ่งนอกเหนือจากพืชน้ำมัน นอกจากนั้นแล้วยีสต์และเชื้อรายังมีคุณสมบัติอื่นๆ ที่เหมาะสมในการที่จะคัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในการผลิตลิปิด คือ สามารถเจริญได้เร็วให้ความหนาแน่นของ

เซลล์สูง (high cell density) ให้ผลผลิตสูง นอกจากนั้นยังสามารถใช้วัตถุดิบราคาถูกในการเจริญ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่าย เช่น โดยการกรองหรือการปั่นเหวี่ยง การสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ทำได้ง่าย (Ratledge and Tan,1990)

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

แหล่งของลิปิด	ร้อยละของกรดไขมันที่พบ								
	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
<i>Rhodotorula gracilis</i>	0	1	18	1	6	41	24	1	9
Palm oil	2	3	37	2	6	38	10	0	0
Soybean oil	0	0.1	10.5	0	3.2	22.3	54.5	8.3	0.2
Sunflower oil	0	0.1	6.7	0	2	12.9	77.5	0	0.5
Olive oil	0	0	16.9	1.8	2.7	61.9	14.8	0.6	0.4

ลิปิดที่พบในยีสต์ (intracellular lipid) ส่วนใหญ่จะสะสมอยู่ที่เซลล์เมมเบรน แต่ใน oleaginous yeast จะพบว่าลิปิดอยู่ในรูปหยดไขมัน (fat droplet) หรือหยदनํ้ามัน (oil droplet) อยู่ภายในเซลล์ ลิปิดที่พบในยีสต์ประกอบด้วยกลีเซอไรด์ (glyceride) ฟอสฟอลิปิด (phospholipids) ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สฟิงโกลิปิด (sphingolipids) และสเตียรอยด์ (steroid compound) ตัวอย่างยีสต์ไขมันสูงแสดงดังตารางที่ 2.4 ชนิดและปริมาณของลิปิดที่พบจะแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ยีสต์ สารอาหาร และสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ pH เป็นต้น (Ratledge and Tan,1990) โดยลิปิดที่พบในยีสต์แสดงดังตารางที่ 2.5

กลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลจะถูกแทนที่ด้วยกรดไขมันตั้งแต่ 1, 2 และ 3 ตำแหน่ง ซึ่งเรียกว่า โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ ตามลำดับ โดยกลีเซอไรด์เป็นลิปิดที่พบมากที่สุดในเซลล์คือ มีถึง 80 % ของลิปิดทั้งหมด และกลีเซอไรด์ที่พบมากที่สุดคือ ไตรกลีเซอไรด์ โดยกรดไขมันที่พบในไตรกลีเซอไรด์ในยีสต์ที่พบมีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 8-24 อะตอม โดยชนิดที่มีคาร์บอนอะตอม 16-18 อะตอม (C16, C18) พบมากที่สุดโดยมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว โดยองค์ประกอบของลิปิดในยีสต์ไขมันสูงแสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.4 ยีสต์ไขมันสูงและปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้สูงสุด (Ratledge and Tan ,1990)

สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณน้ำมันสูงสุด (%โดยน้ำหนักแห้ง)
<i>Candida curvata</i> D	58
<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	65
<i>Endomycopsis vernalis</i>	65
<i>Lipomyces lipoter</i>	64
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63
<i>Rhodospiridium glutinis</i>	72
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของลิปิดในยีสต์ไขมันสูงบางสายพันธุ์ (Ratledge and Tan, 1990)

สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณและชนิดของลิปิด (%โดยน้ำหนักแห้ง)							
	TG	DG	MG	FFA	S	SE	PL	G
<i>Cryptococcus albidus</i>	92	2.5	1	3	1	1	2	–
<i>Lipomyces stakeyi</i>	95	1	–	<1	1	–	3	–
<i>Rhodotorula glutinis</i>	67	–	–	4	2	7	11	6
<i>Tricosporon pullulans</i>	82	1	–	–	10	1	4	–

TG: Triglyceride, DG: diglyceride, MG: monoglyceride, FFA: free fatty acid, S: sterol, SE: sterol ester, PL: phospholipids, G: glycolipid

ตารางที่ 2.6 ชนิดของกรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงสายพันธุ์ต่างๆ (Ratledge and Tan, 1990)

สายพันธุ์	ปริมาณของกรดไขมัน (% โดยน้ำหนักแห้ง)									
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0	23:0	24:0
Candida 107	44	5	8	31	9	1	–	–	–	–
Candida curvata	25	–	10	57	7	–	–	–	–	–
Cryptococcus albidus	16	1	3	56	–	3	7	12	–	–
Lipomyces lipoter	37	4	7	48	3	–	–	–	–	–
Rhodosporidium toruloides	18	3	3	66	–	–	–	–	3	6
Rhodotorula glutinis	10	9	–	19	44	16	–	–	–	–
Trichosporon ceutanium	13	–	22	50	–	–	–	–	–	–

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์

1) สารอาหาร (substrate)

สารอาหารหลักที่มีผลต่อการผลิตลิปิดของยีสต์ คือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่ผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ จะแตกต่างกัน เช่น ยีสต์ *Candida* 107 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณลิปิด 42% โดยน้ำหนัก และกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่คือ กรดปาล์มติก (C16:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ในขณะที่เมื่อเจริญบนอาหารที่มี Hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณลิปิด 19% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่คือ กรดลิโนเลอิก (C18 :2) (Gill et al., 1997)

ยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 76% ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 70 g/L รายงานการศึกษาการผลิตลิปิดของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula glutinis*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผงชูรสพบว่า *R. glutinis* มีการเจริญและสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์และน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์เมื่อผ่านกระบวนการ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) แล้วมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลได้ อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่ำมักจำเป็นเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ในช่วงแรกของการเจริญ แต่ในช่วงหลังของการเจริญจะเป็นการเปลี่ยนคาร์บอนให้เป็นลิปิดต้องใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง ยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C/N ratio เท่ากับ 77 ให้ผลผลิตลิปิดสูงสุด ชนิดของกรดไขมันที่พบแปรตามค่าของ C/N ratio (Turcotte and Kosaric, 1989; Li et al., 2007)

ยีสต์ *C. viswanathii* OYS3 เจริญได้ดีในกลีเซอรอลและกากน้ำตาลโดยให้เซลล์ 7.8, 7.1 กรัม/ลิตร และปริมาณลิปิด 37.2%DCW และ 39.4%DCW ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปิดที่สกัดได้พบว่าเป็นกรดไขมันชนิดสายยาวโดยมีกรดปาล์มติก กรดสเตียริกและกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช (Leesing and Nontaso, 2011)

2) ระยะเวลาและระบบการเพาะเลี้ยง

การเลี้ยงยีสต์ด้วยการหมักแบบกะ พบว่ายีสต์เมื่อเข้าสู่ช่วงท้ายของการเจริญ (growth phase) พบว่ามีการสะสมลิปิดสูงสุด เช่น เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus albidus* ภายใต้สภาวะการจำกัดไนโตรเจนและมีไนโตรเจนมากเกินพอ พบว่าในสภาวะที่จำกัดไนโตรเจน ปริมาณลิปิด

จะสูงสุดและให้น้ำหนักเซลล์ (biomass) มากที่สุด กรดไขมันที่พบมากประกอบด้วย กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก และกรดปาล์มิติก องค์ประกอบของกรดไขมันจะเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ในช่วงแรกของการเจริญ ปริมาณของกรดโอเลอิก กรดปาล์มิติก และกรดสเตียริก ไม่สูงมากนัก ในขณะที่ linoleic acid, linolenic acid เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นปริมาณของ linoleic acid, linolenic acid ลดลง ส่วนปริมาณของ oleic acid, palmitic acid, steric acid จะเพิ่มขึ้น ดังนั้นชนิดของกรดไขมันที่ยีสต์ผลิตจะขึ้นกับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยปกติเมื่อเซลล์จุลินทรีย์ผลิตลิปิดจะให้ปริมาณเซลล์หรือ biomass ต่ำ ดังนั้นเพื่อเพิ่มการผลิตเซลล์ให้สูงขึ้นจึงมีการเพาะเลี้ยงแบบกะป้อน (fed-batch fermentation) ซึ่งเป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลดีในการผลิตทั้งปริมาณเซลล์และลิปิดในเวลาเดียวกัน การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* Y4 ในการหมักแบบกะป้อนเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเซลล์สะสมลิปิดสูงถึง 67.5% โดยน้ำหนักแห้ง และน้ำมันที่สกัดได้ประกอบด้วยกรดไขมันหลักๆ คือ กรดปาล์มิติก กรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดลิโนเลอิก ซึ่งใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ (Li et al., 2007)

3. ปัจจัยอื่นๆ เช่น การให้อากาศ (aeration) pH และอุณหภูมิ

เมื่อมีการให้อากาศเพิ่มขึ้นพบว่ายีสต์มีการผลิตเซลล์และปริมาณลิปิดเพิ่มขึ้น อุณหภูมิลดลงพบว่าจะมีผลทำให้ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีปริมาณเพิ่มขึ้น

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Angerbauer และคณะ (2008) ศึกษาศักยภาพในการสะสมลิปิดของยีสต์ *Lipomyces starkeyi* เมื่อเจริญในน้ำเสีย (sewage sludge) พบว่าการสะสมลิปิดจะขึ้นอยู่กับการคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N-ratio) โดย C/N-ratio 150 และ pH 5.0 จะมีปริมาณลิปิดสูงสุด 68% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่าการเพาะเลี้ยงยีสต์ในน้ำเสียจะไม่มีผลกระทบต่อการเจริญและการสะสมลิปิด โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิปิดที่ได้เมื่อเลี้ยงบนอาหาร basal medium และบน sewage sludge พบว่าปริมาณการสะสมลิปิดไม่แตกต่างกันนัก ลิปิดที่ผลิตได้จากยีสต์ *Lipomyces starkeyi* ที่เจริญบนน้ำเสียประกอบด้วยกรดไขมัน ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้

รายงานการวิจัยพบว่ายีสต์บางกลุ่มมีอัตราการเจริญสูงและมีความสามารถในการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ตัวอย่างยีสต์ที่สะสมลิปิดสูง เช่น *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus* sp., *Rhodotolura* sp. (Muniglia et al, 2005; Tehlivets et al, 2007) และน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์มี triacylglycerol เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งคล้ายกับน้ำมันพืชโดยเฉพาะน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus curvatus* (*Candida curvata*)

D) (Moon et al, 1978) การเพาะเลี้ยงยีสต์ *C. curvatus* ด้วยการหมักแบบกะป๋องในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 53% ในเวลา 172 ชั่วโมง ที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 75 และน้ำมันที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดโอเลอิก กรดปาล์มติกและกรดสเตียริก (Hassan et al, 1996)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida* 107 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสด้วยการหมักแบบต่อเนื่องในระบบ single-state continuous culture ที่ค่าความเจือจาง (dilution rate) ของระบบเท่ากับ 0.06 h^{-1} และจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์โดยมีอัตราการผลิตลิปิดจำเพาะเท่ากับ 0.059 กรัมลิปิด/กรัมยีสต์/ชั่วโมง (Gill et al, 1977) ยีสต์ *C. curvatus* เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหมักแบบกะป๋อง ระยะเวลาการหมัก 50 ชั่วโมง พบว่าให้ปริมาณเซลล์ 118 กรัม/ลิตร ปริมาณลิปิด 25% โดยน้ำหนัก อัตราการผลิตลิปิด 0.59 กรัมลิปิด/ลิตร/ชั่วโมง และกรดไขมันหลักที่พบประกอบด้วยกรดลิโนเลอิก (C18:2) กรดสเตียริก (C18:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) (Meesters et al, 1996) ยีสต์ *Rhodotorula glutinis* IIP-30 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหมักแบบกะป๋องภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจนให้ผลผลิตลิปิดสูงสุด 66% โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และ pH 4.0 (Johnson et al, 1992) เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Candida curvata* ในน้ำสกัดจากกล้วยด้วยการหมักแบบกะป๋องพบเซลล์มีอัตราการเจริญสูงและมีการสะสมลิปิด 30% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Vega et al, 1988)

ยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* ATCC 10788 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C/N ratio เท่ากับ 77 ให้ผลผลิตลิปิดสูงสุด ชนิดของกรดไขมันที่พบแปรตามค่าของ C/N ratio (Turcotte and Kosaric, 1989) ยีสต์ *R. toruloides* มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 76% ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร (Li et al, 2006)

รายงานการศึกษาการผลิตลิปิดของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula glutinis*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้ น้ำทิ้งจากการผลิตผงชูรสพบว่า *R. glutinis* มีการเจริญและสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์และน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์เมื่อผ่านกระบวนการ transesterification แล้วมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลได้ (Xue et al, 2006)

จุลินทรีย์ที่มีการผลิตและสะสมลิปิดภายในเซลล์มีจำนวนมาก ปริมาณลิปิดที่สะสมภายในเซลล์และคุณสมบัติของลิปิดขึ้นกับชนิดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะในการเพาะเลี้ยง รายงานการวิจัยพบว่ายีสต์มีอัตราการเจริญสูงและมีความสามารถในการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus* sp., *Rhodotolura* sp., (Muniglia et al, 2005; Tehlivets et al, 2006) และนอกจากนั้นน้ำมันที่

ผลิตจากยีสต์มีคุณสมบัติของ triacylglycerol fraction คล้ายกับน้ำมันพืชโดยเฉพาะน้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ *Cryptococcus curvatus* (*Candida curvata* D) (Moon et al, 1978)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus curvatus* ด้วยการหมักแบบกึ่งกะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 53 % ในเวลา 172 ชั่วโมง (Hassan et al, 1996) การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida* 107 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสด้วยระบบการหมักแบบต่อเนื่อง single-state continuous culture ที่ค่าความเจือจาง (dilution rate) ของระบบเท่ากับ 0.06 h^{-1} และจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์โดยมีอัตราการสะสมลิปิดจำเพาะ (specific rate of lipid formation) เท่ากับ 0.059 กรัม ลิปิด/กรัมยีสต์/ชั่วโมง (Gill et al, 1977)

เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Candida curvata* ในน้ำสกัดจากกล้วยด้วยระบบการหมักแบบกึ่งกะพบเซลล์มีเจริญสูงและมีการสะสมลิปิด 30% ของน้ำหนักแห้ง (Vega et al, 1988) รายงานการศึกษาการผลิตลิปิดของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula glutinis*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผงชูรส monosodium glutamate พบว่า *Rhodotorula glutinis* มีการเจริญและสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์และน้ำมันที่สกัดได้จากยีสต์เมื่อผ่านกระบวนการ transesterification แล้วมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลได้ (Xue et al, 2006)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 ในการหมักแบบกะป้อนเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเซลล์สะสมลิปิดสูงถึง 67.5% โดยน้ำหนักแห้ง และให้ผลผลิตลิปิด (lipid productivity) เท่ากับ 0.54 กรัมลิปิด/ลิตร/ชั่วโมง และน้ำมันที่สกัดได้ประกอบด้วยกรดไขมันหลักๆ คือ กรดปาล์มติก กรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดลิโนเลอิก ซึ่งใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ (Li et al, 2007)

ยีสต์ไฮโซเลท *Candida viswanathii* OYS3 เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 90 กรัม/ลิตร ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน อุณหภูมิ 30°C ให้ปริมาณลิปิดที่ 4.10 กรัมลิปิด/ลิตรหรือ 52.7% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเลี้ยงแบบกึ่งกะให้ปริมาณเซลล์ 9.11 กรัม/ลิตร ปริมาณลิปิด 59.5% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และยีสต์ *C. viswanathii* OYS3 เจริญได้ดีในกลีเซอรอลและกากน้ำตาลโดยให้เซลล์ 7.8, 7.1 กรัม/ลิตร และปริมาณลิปิดร้อยละ 37.2 และ 39.4 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปิดที่สกัดได้พบว่าเป็นกรดไขมันชนิดสายยาวโดยมีกรดปาล์มติก กรดสเตียริกและกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลัก เช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช (Leesing and Nontaso, 2011)

Huang และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตน้ำมันจากยีสต์ *Trichosporon fermentus* เมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยฟางข้าว (rice straw hydrolysate) พบว่ายีสต์ให้ปริมาณลิปิดสูง 41% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

การเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูง *Torulaspora maleeae* Y30 ที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชเขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ด้วยการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าให้อัตราการผลิตลิปิด (volumetric lipid production rate) เท่ากับ 0.382g/L/d ปริมาณลิปิด 3.06g/L เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 90g/L และ 0.2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Leesing and Karraphan, 2011)

การศึกษาการผลิตลิปิดโดยยีสต์ไขมันสูง *Cryptococcus curvatus* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนได้ปริมาณเซลล์ 69g/L และปริมาณลิปิด 48% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยลิปิดที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดโอเลอิก กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก และกรดลิโนเลอิก (Thiru et al., 2011)

Xu et al (2012) ศึกษาการผลิตลิปิดในยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* โดยใช้กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะขั้นตอนเดียว (one-stage batch cultivation) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าการใช้กลีเซอรอลดิบเซลล์เจริญได้ดีได้ปริมาณมวลเซลล์สูง 26.7g/L และได้ปริมาณลิปิด 70% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยกรดไขมันหลักที่พบคือกรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0), C18:0 (stearic acid), C18:1 (oleic acid) และ C18:2 (linoleic acid) ที่ 26%, 12%, 45% และ 11% ของกรดไขมันทั้งหมด (total fatty acid) ตามลำดับ

Galafassi et al (2012) ศึกษาการผลิตลิปิดโดยยีสต์ไขมันสูง *Rhodotorula graminis* เมื่อใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยฟางข้าวโพดที่ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษออก (undetoxified corn stover hydrolysate) พบว่าได้อัตราการผลิตลิปิด 0.21g/L/h และปริมาณลิปิด 34% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนได้อัตราการผลิตลิปิด 0.15g/L/h และปริมาณลิปิด 54% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

Zhang et al. (2011) รายงานการผลิตลิปิดจากยีสต์ *Cryptococcus curvatus* O3 จากกลูโคส โดยศึกษาผลของปริมาณกลูโคสและไนโตรเจน เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะในระดับฟลาสก์เขย่าที่ 30C ได้ปริมาณเซลล์ 51.8kg/m³ และปริมาณลิปิด 651g/kg ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนในถังหมัก Stirred-tank fermentor ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 185 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์ 104.1kg/m³ ปริมาณลิปิด 827g/kg และอัตราการผลิตลิปิด 0.47kg/m³/h เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันด้วยเครื่อง GC พบว่าเป็นกรดไขมันชนิดสายยาว (long-chain fatty acids) ประกอบด้วยกรดปาล์มิติก (palmitic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) กรดโอเลอิก (oleic acid) และลิโนเลอิก (linoleic acid)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและน้ำตาลที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพด (corn cob hydrolysate) ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะพวดเมื่อใช้กลูโคส 4% (w/w) เซลล์เจริญสูงสุด โดยมีปริมาณเซลล์ 9.4g/L ปริมาณลิปิด 6.0g/L หรือ 63.5% (w/w) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงแบบกะพวดผลการยับยั้งการเจริญและการผลิตลิปิด (inhibitory effect) เมื่อกลูโคสเข้มข้น 6% และเมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะพวดสามารถลดผลของ inhibitory effect ลงได้ โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร corn cob hydrolysate ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 4% และเติมกลูโคส 2% ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงได้ปริมาณเซลล์ 10.8 g/L และปริมาณลิปิด 61.3% (w/w) ผลผลิตรวมของลิปิด (overall lipid production) เพิ่มขึ้นเป็น 1.08g/L/d ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะพวดใน corn cob hydrolysate ที่มีกลูโคสเริ่มต้น 4% และเติม corn cob hydrolysate ที่มีกลูโคส 2% (Huang Chang et al., 2013)

Wang et al., (2012) ศึกษาการผลิตลิปิดโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* 21167 พบว่าอิออนบวกของโลหะ เช่น Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{3+} มีผลต่อการสะสมลิปิดในเซลล์ ยีสต์ หลังจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch hydrolysate) 8% เป็นเวลา 144 ชั่วโมง ในระดับฟลาสก์ได้ปริมาณเซลล์ $18.5g/m^3$ ปริมาณลิปิด 63.2% (w/w) น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือและน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเท่ากับ $15g/m^3$, $3.2g/m^3$ ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกันในถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 192 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์ $22.0g/m^3$ ปริมาณลิปิด 63.4% (w/w) น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือและน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือเท่ากับ $5.4g/m^3$, $0.3g/m^3$ ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงว่าน้ำตาลถูกใช้ไปเพื่อการเจริญและการผลิตลิปิดเป็นหลัก โดยมากกว่า 96.8% ของกรดไขมันที่พบในยีสต์ *R. toruloides* 21167 คือ C16:0, C18:0, C18:1 และ C18:2 โดยเฉพาะ C18:1 (53.34%)

บทที่ 3

วิธีการศึกษาวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1) วัสดุอุปกรณ์

ฟลasks ขนาด 250, 500, 1,000 มิลลิลิตร
หลอดทดลอง ขนาด 16x150 และ 20x150 มิลลิลิตร
ลูป เชื้อ และ ตะเกียง บunsen
ปิเปต ขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร
ไมโครปิเปต ขนาด 100–1000 μ L
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
เครื่องบ่มแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer)
เครื่องชั่ง (Balance)
ตู้อบแห้ง (Hot air oven)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifugation)
กล่องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 1) อาหารสูตรสมบรูณ์ (Enrichment medium)
- 2) อาหารสูตรไนโตรเจนต่ำ (Low-nitrogen medium)
- 3) อาหารสำหรับผลิตลิพิด (Lipid accumulation medium)

3.1.3 สารเคมี

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (ภาคผนวก ก)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณลิปิดโดยวิธี Know and Rhee (ภาคผนวก ก)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ภาคผนวก ก)

3.2 การคัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างดิน

3.2.1 การเก็บตัวอย่างดิน โดยเก็บตัวอย่างดินในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่น อุตรดิตถ์ กาฬสินธุ์ และนครราชสีมา มาแยกให้ได้เชื้อยีสต์บริสุทธิ์ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.2 การคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อให้ได้ยีสต์หลากหลายสายพันธุ์โดยนำตัวอย่างดิน ในข้อ 3.2.1 จำนวน 1.0g ถ่ายใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารสูตรสมบูรณ์ (enrichment medium) ปริมาตร 10mL ในหลอดทดลองขนาด 20mL บ่มในตู้บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของจุลินทรีย์มาแยกยีสต์ให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) หรือเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยเทคนิค spread plate culture และการขีดลากแบบไขว้ (cross-streak technique) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง YEPG ที่มีกลูโคสสูง (7%, w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์มาคัดเลือกเบื้องต้น (primary screening) เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำกัดปริมาณไนโตรเจน หรือสูตรไนโตรเจนต่ำ (low-nitrogen medium) จากนั้นคัดเลือกยีสต์ไอโซเลทที่สะสมลิปิดในเซลล์มาเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียง (YPG slant) ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.3 การคัดเลือกยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตลิปิด

เพาะเลี้ยงยีสต์แต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกเบื้องต้นได้ในข้อ 3.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน (low-nitrogen medium) โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Li et al, 2006) ในระดับฟลาสก์เขย่า ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28-30°C เป็นเวลา 3-5 วัน เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง เซลล์และน้ำหมักที่ได้นำไปตรวจวิเคราะห์ผลการทดลองดังนี้ วัดการเจริญของยีสต์โดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง, วัดปริมาณลิปิดตามวิธีการของ Know and Rhee (1986), วัดปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี

DNS method (Miller, 1959) จากนั้นคำนวณหาค่า cell yield ($Y_{x/s}$) อัตราการผลิตเซลล์ (volumetric cell mass production rate, Q_x , g cells/L/d) อัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate, g/L/d) และคัดเลือกยีสต์ไอโซเลทที่มีอัตราการผลิตลิปิดสูงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.4 การศึกษาสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตและสะสมลิปิด

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์พื้นถิ่นลิปิดสูงไอโซเลทที่มีอัตราผลิตและสะสมลิปิดสูงที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 3.3 มาศึกษาหาสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตและสะสมลิปิดด้วยการหมักแบบกะ (batch cultivation) ในระดับฟลask เชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lipid accumulation medium ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลask ขนาด 250mL บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ดังนี้

3.4.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตลิปิด โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.3 จนกระทั่งเข้าสู่ปลาย logarithmic phase หรือต้น stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการสะสมลิปิดในเซลล์สูง ระยะเวลาการหมัก 10 วัน เก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อตรวจผลการทดลอง เลือกระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อศึกษาในข้อ 3.4.2

3.4.2 ศึกษาผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 3.4.1 โดยแปรผันค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 3-7 ตรวจวิเคราะห์ผลการทดลอง เลือก pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อศึกษาในข้อ 3.4.3

3.4.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง โดยเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่คัดเลือกแล้วในข้อ 3.4.2 โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มระหว่าง 25-35°C ตรวจวิเคราะห์ผลการทดลอง เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาในข้อ 3.4.4

3.4.4 ศึกษาผลของชนิดและแหล่งไนโตรเจน โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่คัดเลือกแล้วในข้อ 3.4.3 โดยแปรผันปริมาณและชนิดของแหล่งไนโตรเจน ตรวจวิเคราะห์ผลการทดลอง เลือกชนิดและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อศึกษาในข้อ 3.4.5

3.4.5 ศึกษาผลของปริมาณกลูโคสหรือผลของอัตราส่วนของ C/N ratio โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่คัดเลือกแล้วในข้อ 3.4.4 โดยการคงที่ปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากข้อ 3.4.4 แปรผันปริมาณกลูโคสที่ค่าต่างๆ ระหว่าง 20-100g/L เลือกปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณลิปิดสูงเพื่อศึกษาในข้อ 3.4.6

3.4.6 ศึกษาผลของการเติมแคตไอออนหรือแอนไอออนบวก โดยเฉพาะลิแกนด์ยีสต์ในสถานะที่คัดเลือกแล้วในข้อ 3.4.5 แปรผันปริมาณของ Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} ที่ค่าต่างๆ ตรวจสอบผลการทดลอง เลือกปริมาณของแคตไอออนชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

การตรวจผลการทดลอง

- 1) การเจริญของยีสต์โดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง
- 2) วิเคราะห์ปริมาณลิปิดโดยวิธีของ Know and Rhee (1986)
- 3) วัดปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

3.5 ศึกษาผลิตน้ำมันจากยีสต์ด้วยการหมักแบบกะและกะป้อนในถังหมัก

ศึกษาการขยายขนาดการผลิตในถังหมักด้วยการหมักแบบกะ (Batch cultivation) และแบบกะป้อน (fed-batch cultivation) ดังนี้

3.5.1 ศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่คัดเลือกแล้วจากผลการทดลองในข้อ 3.4.6 โดยการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรทำงาน 1.5 ลิตร เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจผลการทดลอง

3.5.2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่คัดเลือกแล้วจากผลการทดลองในข้อ 3.4.6 โดยการหมักแบบกะป้อน (fed-batch fermentation) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรทำงาน 1.5 ลิตร ควบคุมระบบโดยการเติมกลูโคสเป็นช่วงๆ เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจผลการทดลอง

การตรวจผลการทดลอง

- 1) วัดอัตราการเจริญของยีสต์โดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง
- 2) วิเคราะห์ปริมาณลิปิดตามวิธีการของ Know and Rhee (1986)
- 3) วัดปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

3.6 การศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่สกัดจากยีสต์

การศึกษาโดยนำเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze dryer) นำเซลล์แห้งที่ได้ โดยนำเซลล์สำหรับ 1.0g มาสกัดน้ำมันโดยวิธี Soxhlet extraction (Baker,

1984) ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ จากนั้นนำน้ำมันที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยไฮโดรไลซ์กรดไขมันและเติมหมู่เมทิลโดยเติมคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตรและไดเอซิลอีเทอร์ 3 มิลลิลิตร ลงในน้ำมันและนำไประเหยที่อุณหภูมิ 40°C จากนั้นเติม 10% BF_3 2 มิลลิลิตรและเมทานอล 1 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100°C 45 นาที ทิ้งให้เย็นเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เฮกเซน 1 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งให้แยกชั้นและนำสารละลายชั้นบนไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Shimadzu, Japan) โดยกรดไขมันในรูป Fatty acid methyl esters (FAMES)

3.7 การบ่งเอกลักษณ์ของยีสต์พื้นถิ่นลิปดสูงที่คัดเลือกได้

ศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ไอโซเลทที่มีการผลิตลิปดสูงที่ได้จากข้อ 3.3 โดยศึกษาสัญญาณวิทยาของโคไลนี รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบ่งเอกลักษณ์ของยีสต์ที่คัดเลือกได้ (Kurtzman and Fell, 1998) ในระดับ Genus และหรือระดับ species ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล

การศึกษาการบ่งเอกลักษณ์เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ซึ่งระบุปียีสต์ของยีสต์โดยการศึกษาลำดับเบสบริเวณ rDNA ในส่วนของ D1/D2 domain ที่อยู่บริเวณปลาย 5' ของยีน 26S rRNA เมื่อสกัด DNA มาทำ PCR ด้วย primer NL-1 (5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') และ NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (Kurtzman and Robnett, 1998) โดยเตรียมปฏิกิริยา PCR reaction คือ ปริมาตรสุดท้าย 100 μl ของ reaction mixture ประกอบด้วย 100ng ของ genomic DNA, 2.5U ของ Taq polymerase, 20 mM ของ dNTP แต่ละชนิด, 40mM ของ primer, 10 mM Tris-HCl และ 1.5 mM MgCl_2 สภาวะ pre-denature ที่ 94°C, 5 นาที, PCR cycle 30 รอบและ denaturation ที่ 94°C, 1 นาที, annealing 55°C, 1 นาที, extension 72°C, 2.5 นาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ amplified product มาทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับเบสของยีสต์ BLAST search เปรียบเทียบลำดับเบสใน EMBL/GenBank database

3.8 ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันยีสต์

เลี้ยงยีสต์ด้วยการหมักที่ยีสต์มีการสะสมลิปิดสูงที่ได้จากข้อ 3.5 เก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์ด้วยการปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและทำแห้งแบบแช่แข็งด้วยเครื่อง freeze dryer จากนั้นศึกษาการผลิตไบโอดีเซลแบบโดยตรง (direct transesterification) โดยศึกษาตามวิธีการของ Bradley and Robert (2011) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างเซลล์แห้ง 1.0g ใส่ลงในฟลasks ขนาด 50mL เติมนเมทานอล 2.0mL และตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน คือ H_2SO_4 ร้อยละ 1.8 (v/v) ของจำนวนเมทานอลที่ใช้ ให้ความร้อนด้วยการนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ $80^{\circ}C$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม (เอทานอลต่อคลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1:2) และน้ำกลั่น 30mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบ/ วินาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนล่างที่เป็นชั้นของ fatty acid methyl esters (FAMES) และไตรกลีเซอไรด์ที่ละลายอยู่ในคลอโรฟอร์มมาแยกตัวทำละลายหรือคลอโรฟอร์มออกด้วยวิธีการระเหย (evaporation) ให้เหลือแต่ส่วนของไบโอดีเซล (FAMES) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณค่าของกรด (acid value) และปริมาณร้อยละของไบโอดีเซลโดยน้ำหนักแห้งยีสต์ที่ใช้

บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัยและอภิปรายผล

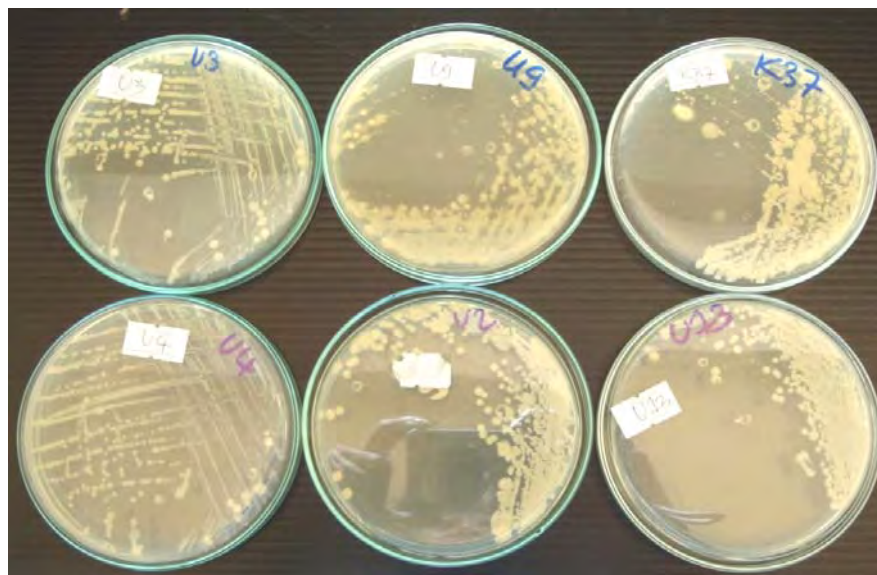
4.1 การคัดเลือกเชื้อยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง

การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดิน โดยเก็บตัวอย่างดินจำนวน 101 ตัวอย่าง จากจังหวัดขอนแก่น (อำเภอเมือง อำเภอน้ำพอง อำเภอกระนวน อำเภอบ้านไผ่ และอำเภอบ้านแฮด) จังหวัดกาฬสินธุ์ (อำเภอยางตลาด อำเภอเมือง) จังหวัดอุดรธานี (อำเภอกุมภวาปี) จังหวัดนครราชสีมา (อำเภอพิมาย อำเภอสีดา และอำเภอประทาย) มาคัดแยกยีสต์โดยชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม มาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน (enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสมบูรณ์ (enrichment medium) ปริมาตรอาหาร 10mL ในหลอดทดลองขนาด 20mL บ่มในตู้บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาคัดแยกเชื้อบนผิวหน้าอาหารแข็งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคการเกลี่ยเชื้อ (spread plate) และขีดลาก (cross streak) บ่มในตู้บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินเบื้องต้นได้ยีสต์จำนวน 155 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินทั้งสิ้น 101 ตัวอย่าง เก็บรักษายีสต์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเอียง (YPG slant) ที่อุณหภูมิ 4°C (รูปที่ 4.1-4.3)

การคัดเลือกยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeast) หรือยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตและสะสมลิปิด นำยีสต์แต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาคัดแยกเบื้องต้น (primary screening) เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์ได้สูง การทดลองโดยนำยีสต์แต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรไนโตรเจนต่ำ (glucose 80 g/L, yeast extract 3.0 g/L, peptone 3.0 g/L, pH 5.0) ปริมาตรอาหาร 20mL ในฟลาสก์ขนาด 50mL บ่มแบบเขย่าที่ 30°C ที่ความเร็วรอบ 130 rpm เป็นเวลา 6 วัน (รูปที่ 4.4) เก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญโดยวัดน้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959) และวัดปริมาณลิปิดในเซลล์ด้วยวิธีของ Kwon and Rhee (1986) จากการคัดเลือกเบื้องต้นได้ยีสต์ที่คาดว่าจะ เป็นยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeast) หรือยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการสะสมลิปิด จำนวน 37 ไอโซเลท โดยมีการสะสมลิปิดในเซลล์ (cellular lipid content, %) มากกว่า 20% โดยน้ำหนักแห้ง (Dried cell weight, DCW) โดยพบว่ายีสต์จำนวน 11 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณลิปิดสูงกว่า 40%DCW ประกอบด้วย YU2/1, YU4/1, YU5/2, YU3.1, YU4.1, YU12.1, YU12.2, YU13.3, YU14.1, YK36.3 และ YK36.4 (รูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.1) การคัดเลือกเบื้องต้นจึงคัดเลือกยีสต์จำนวน 11 ไอโซเลทเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.1 การแยกยีสต์จากตัวอย่างดินด้วยการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนยีสต์ในอาหารสูตรสมบูรณ์ (Enrichment medium)



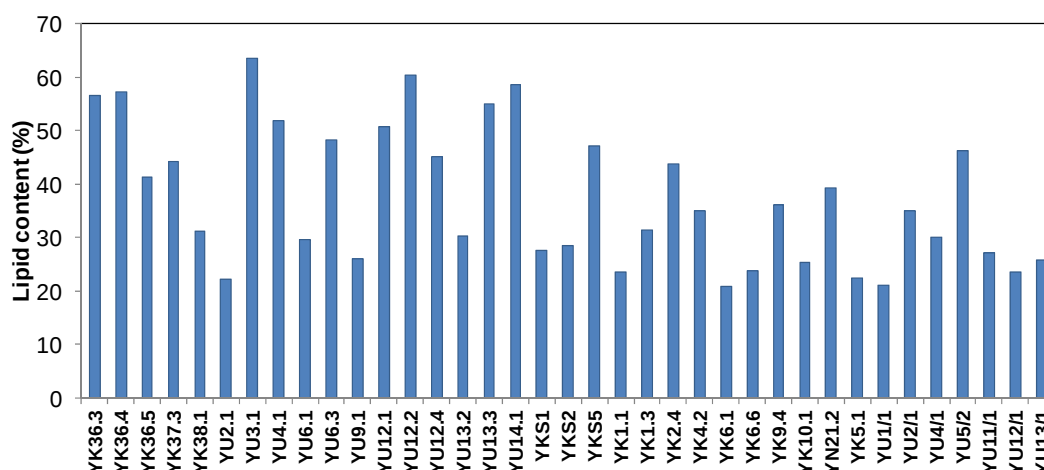
รูปที่ 4.2 การแยกให้ได้เชื้อยีสต์บริสุทธิ์บนผิวหน้าอาหารแข็งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.3 การแยกเชื้อด้วยเทคนิคการขีดไขว้ (cross streak) บนผิวหน้าอาหารแข็งบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.4 การคัดเลือกยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeast) เบื้องต้น (primary screening) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรไนโตรเจนต่ำ (glucose 80 g/L, yeast extract 3.0 g/L, peptone 3.0 g/L, pH 5.0) ปริมาตรอาหาร 20mL ในฟลasks ขนาด 50mL บ่มแบบเขย่าที่ 30°C ที่ความเร็วรอบ 130 rpm เป็นเวลา 6 วัน



รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบปริมาณลิปิด (lipid content, %DCW) ของยีสต์ที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรไนโตรเจนต่ำ (low-nitrogen medium) บ่มแบบเขย่าที่ 30°C ที่ความเร็วรอบ 130 rpm เป็นเวลา 6 วัน

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) และอัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate) ของยีสต์ที่คัดเลือกได้ บ่มที่ 30°C, 130 rpm, 6 วัน

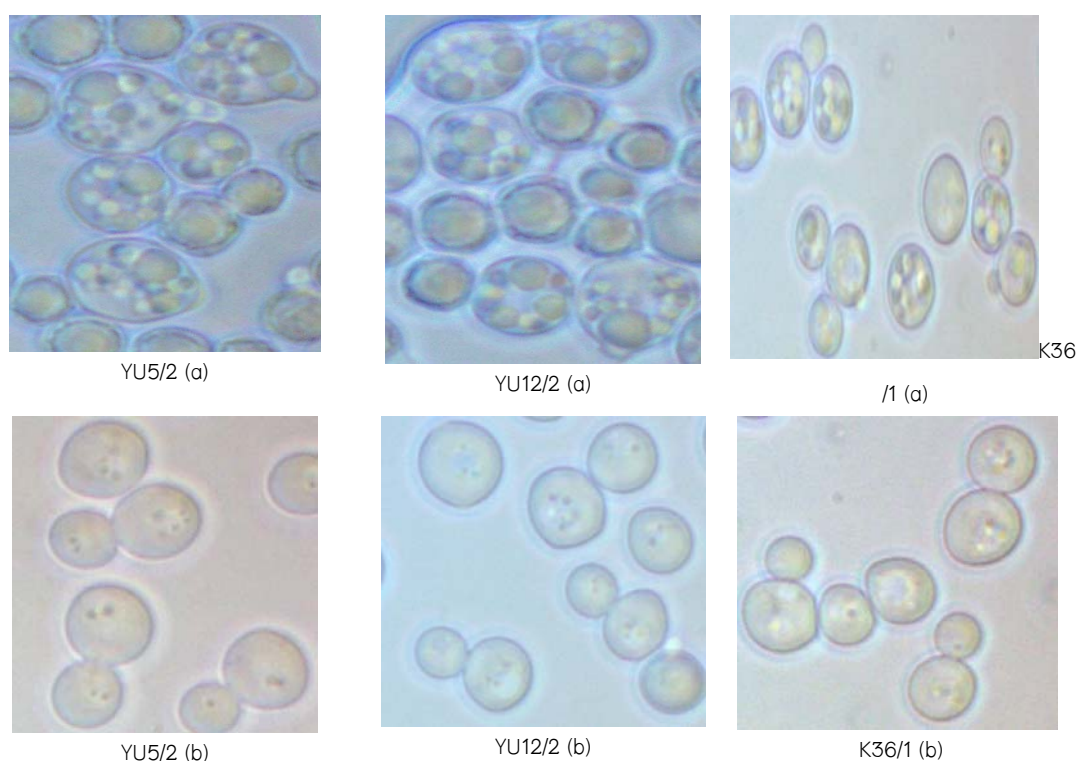
Yeast isolates	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Lipid production rate (g/L/d)
YK36.3	11.1	6.3	56.5	1.05
YK36.4	9.0	5.2	57.3	0.87
YK36.5	10.6	4.4	41.4	0.73
YK37.3	11.0	4.9	44.3	0.82
YK38.1	10.3	3.2	31.3	0.53
YU2.1	8.4	1.9	22.1	0.32
YU3.1	10.4	6.6	63.6	1.10
YU4.1	10.0	5.2	51.9	0.87
YU6.1	2.0	0.6	29.7	0.10
YU6.3	8.6	4.1	48.2	0.68
YU9.1	2.2	0.6	26.1	0.10
YU12.1	11.3	5.7	50.7	0.95
YU12.2	11.7	7.1	60.4	1.18

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) และอัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate) ของยีสต์ที่คัดเลือกได้ บ่มที่ 30°C, 130 rpm, 6 วัน (ต่อ)

Yeast isolates	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Lipid production rate (g/L/d)
YU12.4	11.2	5.0	45.1	0.83
YU13.2	10.3	3.1	30.2	0.52
YU13.3	10.2	5.6	54.9	0.93
YU14.1	10.5	6.2	58.7	1.03
YKS1	9.6	2.7	27.7	0.45
YKS2	13.3	3.8	28.4	0.63
YKS5	14.5	6.8	47.1	1.13
YK1.1	7.7	1.8	23.5	0.30
YK1.3	6.5	2.0	31.4	0.33
YK2.4	10.8	4.7	43.7	0.78
YK4.2	6.8	2.4	34.9	0.40
YK6.1	10.6	2.2	20.8	0.37
YK6.6	10.9	2.6	23.7	0.43
YK9.4	10.6	3.8	36.2	0.63
YK10.1	5.8	1.5	25.4	0.25
YN21.2	7.4	2.9	39.3	0.48
YK5.1	9.3	2.1	22.5	0.35
YU1/1	13.1	2.8	21.1	0.47
YU2/1	13.9	4.5	34.9	0.75
YU4/1	12.8	3.8	30.0	0.63
YU5/2	13.1	6.0	46.2	1.00
YU11/1	12.1	3.3	27.1	0.55
YU12/1	13.3	3.1	23.6	0.52
YU13/1	14.7	3.8	25.8	0.63

หมายเหตุ : Y=yeast, K= Khon Kaen, KS= Kalasin, U=Udonthani, N= Nakorn Ratchasima

การคัดเลือกยีสต์ไขมันสูงเบื้องต้นโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้จำนวน 11 ไอโซเลท ดังนี้คือ ไอโซเลท YU2/1, YU4/1, YU5/2, YU3.1, YU4.1, YU12.1, YU12.2, YU13.3, YU14.1, YK36.3 และ YK36.4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรไนโตรเจนต่ำ ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลาสก์ขนาด 250mL บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 วัน ผลการศึกษาพบว่ายีสต์ไอโซเลท YK36.4, YU12.1 และ YU5/2 ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ โดยยีสต์ไอโซเลท YK36.4 ให้ปริมาณลิปิด 4.02 g/L หรือ 37.58% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) ยีสต์ไอโซเลท YU12.1 ให้ปริมาณลิปิด 4.05 g/L หรือ 35.53%DCW และยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ให้ปริมาณลิปิด 3.77g/L หรือ 41.84%DCW เมื่อศึกษารูปร่างของเซลล์และลักษณะของลิปิดในรูปหยดน้ำมัน (oil droplet) ของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ phase-contrast โดยเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติและสูตรไนโตรเจนต่ำ พบว่าในอาหารสูตรไนโตรเจนต่ำเซลล์สะสมหยดน้ำมันภายในเซลล์ ดังรูปที่ 4.6 โดยจากการศึกษาในขั้นตอนนี้จึงคัดเลือกยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.6 รูปร่างของเซลล์ยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำและกลูโคสสูง (nitrogen-limiting medium) (a) และในอาหารสูตร YM broth ปกติ (b) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase-contrast กำลังขยาย 1000 เท่า

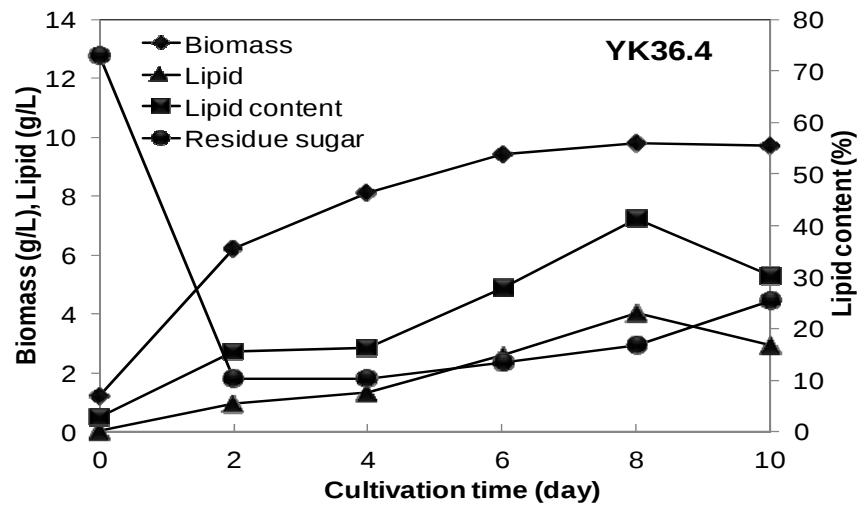
4.2 การศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไขมันสูง

4.2.1 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการผลิตลิปิด

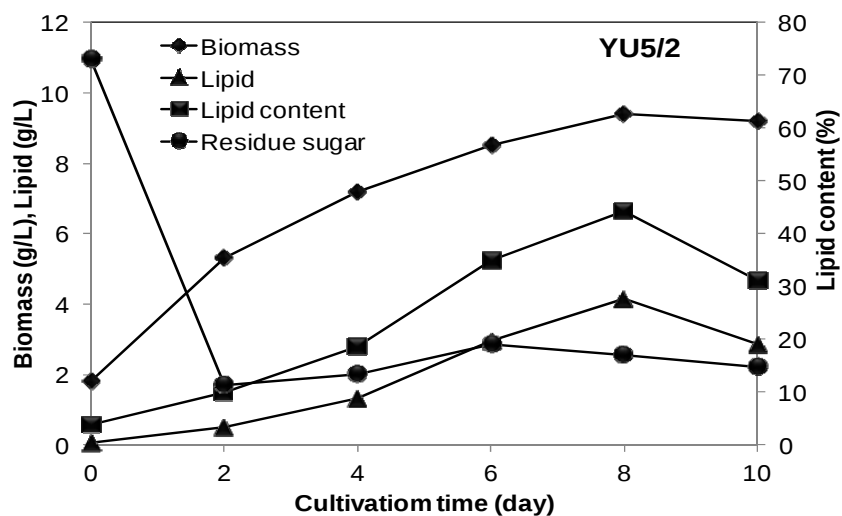
การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้จำนวน 3 ไอโซเลท คือ YK36.4, YU5/2 และ YU12.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lipid accumulation medium (Glucose 80 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L, yeast extract 0.75 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 0.4 g/L, ZnSO_4 4.4 mg/L, CaCl_2 25 mg/L, MnCl_2 0.05 mg/L, CuSO_4 0.3mg/L, pH5.0) ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลาสก์ขนาด 250mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm ที่ 30°C เป็นเวลา 10 วัน

จากการศึกษาพบว่ายีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีการเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ในวันที่ 2 และเข้าสู่ช่วงท้ายการเจริญ (late log phase) หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase ในวันที่ 8 การผลิตและสะสมลิปิดของเซลล์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญ (รูปที่ 4.7–4.9) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญพบว่าไอโซเลท YU12.1, YK36.4 ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 9.86g/L, 9.80g/L ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตเซลล์ (volumetric cell mass production rate, Q_x) เท่ากันที่ 1.23g/L/d ในขณะที่ไอโซเลท YU5/2 ให้ปริมาณเซลล์ 9.40g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.18g/L/d เมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิปิดที่ผลิตโดยยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท YU5/2 ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดคือ 4.16g/L หรือ 44.24%DCW อัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate) 0.52g/L/d (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่ไอโซเลท YK36.4 ให้ปริมาณลิปิด 4.04g/L หรือ 41.20%DCW อัตราการผลิตลิปิด 0.51g/L/d และไอโซเลท YU12.1 ให้ปริมาณลิปิด 3.63g/L หรือ 36.79%DCW อัตราการผลิตลิปิด 0.45g/L/d

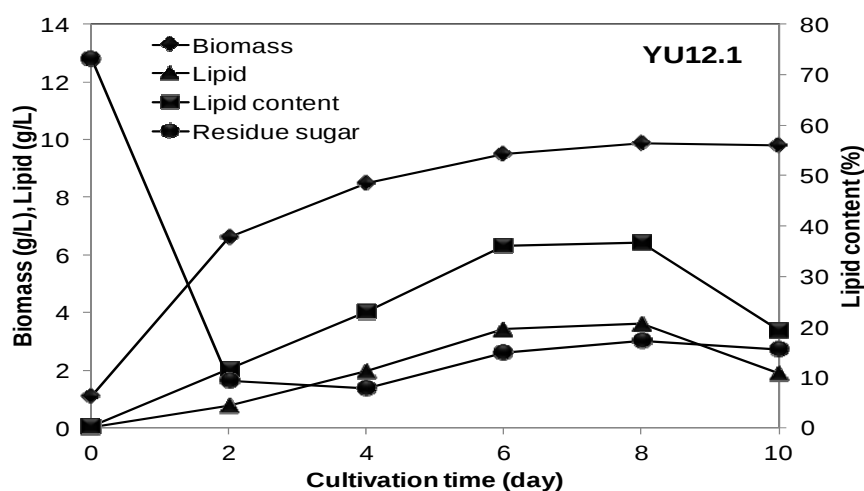
ผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Li et al. (2007) ที่เพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus albidus* ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน พบว่าช่วงท้ายของการเจริญยีสต์จะมีปริมาณลิปิดสูงที่สุดและให้น้ำหนักเซลล์มากที่สุด จากผลการศึกษาในขั้นตอนนี้จะเห็นว่าไอโซเลท YU5/2 ให้อัตราการผลิตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลท YK36.4 และ YU12.1 ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลท YU5/2 เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.7 การเจริญในรูปน้ำหนักแห้ง (biomass, g/L) ปริมาณลิปิด (lipid, g/L) ปริมาณลิปิดโดยน้ำหนักแห้ง (Lipid content, %) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar, g/L) ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YK36.4 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm ที่ 30°C, 10 วัน



รูปที่ 4.8 การเจริญในรูปน้ำหนักแห้ง (biomass, g/L) ปริมาณลิปิด (lipid, g/L) ปริมาณลิปิดโดยน้ำหนักแห้ง (Lipid content, %) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar, g/L) ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm ที่ 30°C, 10 วัน



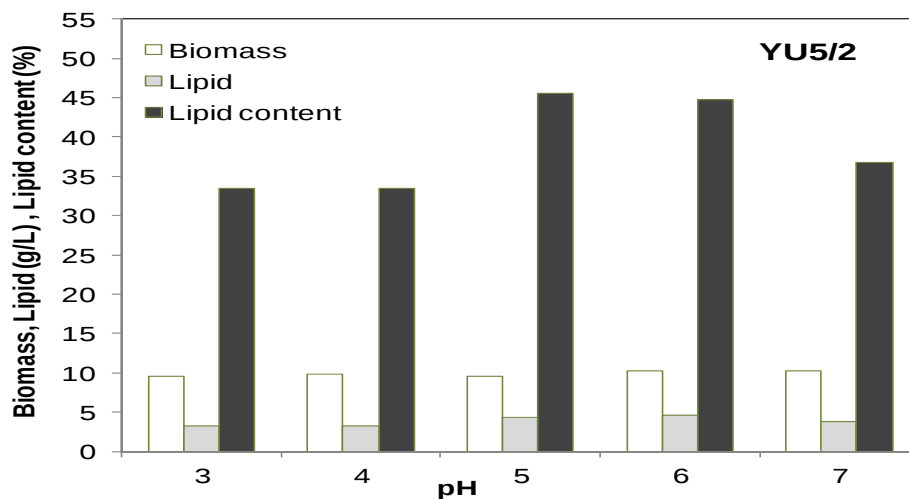
รูปที่ 4.9 การเจริญในรูปน้ำหนักแห้ง (biomass, g/L) ปริมาณลิปิด (lipid, g/L) ปริมาณลิปิดโดยน้ำหนักแห้ง (Lipid content, %) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar, g/L) ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU12.1 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm ที่ 30°C, 10 วัน

ตารางที่ 4.2 แสดงการเจริญ (Biomass) การผลิตลิปิด อัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate) อัตราการผลิตมวลเซลล์ (volumetric cell mass production rate) ของยีสต์ไขมันสูงที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Lipid accumulation medium ที่ 30°C, 8 วัน

Yeast isolates	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Volumetric cell mass production rate (Q_x) (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
YK36.4	9.80	4.04	41.20	1.23	0.51
YU5/2	9.40	4.16	44.24	1.18	0.52
YU12.1	9.86	3.63	36.79	1.23	0.45

4.2.2 ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 4.2.1 และแปรผันค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 3, 4, 5, 6 และ 7 ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลasks ขนาด 250mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน ผลการทดลองดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสะสมลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ตารางที่ 4.3 ผลของค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ (biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

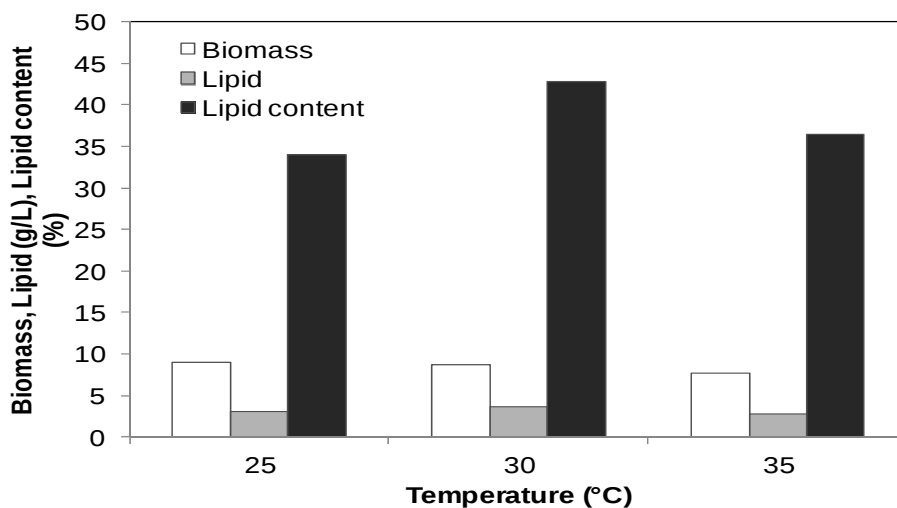
pH	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Q_x (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
3	9.60	3.22	33.52	1.20	0.40
4	9.80	3.27	33.47	1.23	0.41
5	9.60	4.36	45.56	1.20	0.55
6	10.19	4.55	44.68	1.27	0.57
7	10.18	3.75	36.80	1.27	0.47

จากรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.3 พบว่ายีสต์ให้ปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นที่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 โดยให้ปริมาณเซลล์ 9.60, 9.80, 9.60, 10.19, 10.18g/L ตามลำดับ และอัตราการผลิตเซลล์ 1.20, 1.23, 1.20, 1.27, 1.27g/L/d ตามลำดับ แต่ให้ปริมาณลิปิดต่างกันโดยปริมาณลิปิดสูงสุด 4.55g/L หรือ 44.68%DCW และอัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 0.57g/L/d เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี pH 6.0 ซึ่งไม่แตกต่างกันมากนักกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 5.0 ซึ่งมีปริมาณลิปิด 4.36g/L หรือ 45.56%DCW และอัตราการผลิตลิปิด 0.55g/L/d ในขณะที่การเพาะเลี้ยงใน

อาหารที่มี pH 3.0, 4.0, 7.0 ให้ปริมาณลิปิด 3.22g/L (33.52%DCW), 3.27g/L (33.47%DCW), 3.75g/L (36.8%DCW) ตามลำดับและอัตราการผลิตลิปิดที่ 0.40, 0.41, 0.47g/L/d ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้น 5.0, 6.0

4.2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์

การศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 4.2.1 ที่ pH 5.0 ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลasks ขนาด 250mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm เป็นเวลา 8 วัน แปรผันอุณหภูมิในการบ่มที่ 25, 30 และ 35°C ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.4 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 30°C ยีสต์ไอโซเลท YU5/2 สะสมลิปิดสูงสุดที่ 3.70 g/L (42.84%DCW) หรืออัตราการผลิตลิปิด 0.46g/L/d และการเพาะเลี้ยงที่ 25°C, 35°C ให้ปริมาณลิปิด 3.06, 2.78g/L และอัตราการผลิตลิปิด 0.38, 0.35g/L/d ส่วนการเพาะเลี้ยงที่ 25°C ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 9.0g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.13g/Ld ส่วนที่ 30°C, 35°C ให้ปริมาณเซลล์ 8.65, 7.65g/L และอัตราการผลิตเซลล์ 1.08, 0.96g/L/d ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิปิดจึงคัดเลือกเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 30°C โดยการเพาะเลี้ยงอุณหภูมิสูงกว่า 30°C เช่นที่ 35°C มีข้อได้เปรียบในแง่ของการควบคุมอุณหภูมิโดยอาจสามารถเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะอุณหภูมิห้องได้ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการควบคุมอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงลงโดยหากขยายขนาดการผลิตสามารถลดต้นทุนระบบหล่อเย็นลงได้



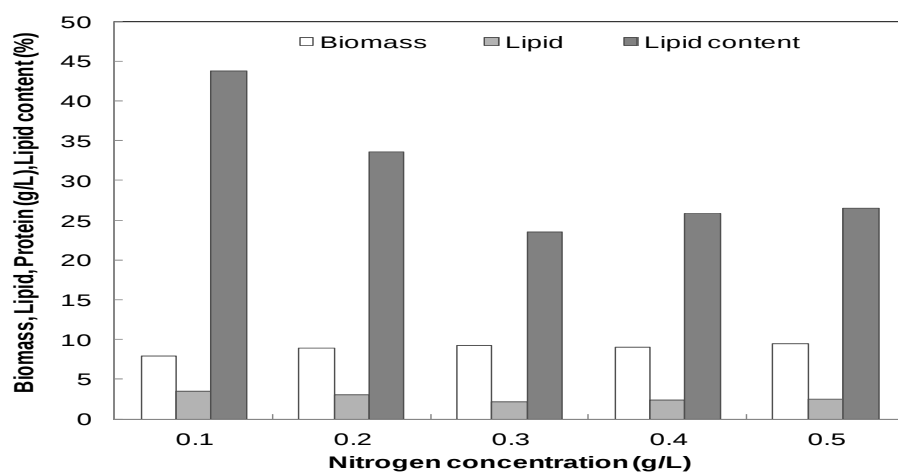
รูปที่ 4.11 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ตารางที่ 4.4 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเซลล์แห้ง การผลิตลิปิด อัตราการ
ผลิตลิปิด อัตราการผลิตมวลเซลล์ของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation
medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เวลา 8 วัน

อุณหภูมิ (°C)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Q_x (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
25	9.00	2.68	3.06	33.98	1.13	0.38
30	8.65	5.19	3.70	42.84	1.08	0.46
35	7.65	4.80	2.78	36.41	0.96	0.35

4.2.4 ผลของปริมาณความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจน

การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 4.2.1 และแปรผันปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 g/L ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลasks ขนาด 250mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm ที่ 30°C เป็นเวลา 8 วัน พบว่ายีสต์ไอโซเลท YU5/2 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 0.1 g/L มีอัตราการเจริญต่ำสุดโดยให้ปริมาณเซลล์ 7.906 g/L แต่มีการผลิตลิปิดสูงสุด 3.46 g/L หรือ 43.77%DCW อัตราการผลิตเซลล์ (Q_x) และอัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 0.99g/L/d และ 0.43g/L/d ตามลำดับผลการศึกษาดังรูปที่ 4.12 และตารางที่ 4.5



รูปที่ 4.12 ผลของปริมาณความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ตารางที่ 4.5 ผลของปริมาณความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Qx (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
0.1	7.91	2.73	3.46	43.77	0.99	0.43
0.2	8.91	4.84	3.00	33.59	1.11	0.38
0.3	9.28	5.07	2.18	23.47	1.16	0.27
0.4	9.03	4.66	2.35	25.79	1.13	0.29
0.5	9.47	4.83	2.51	26.55	1.18	0.31

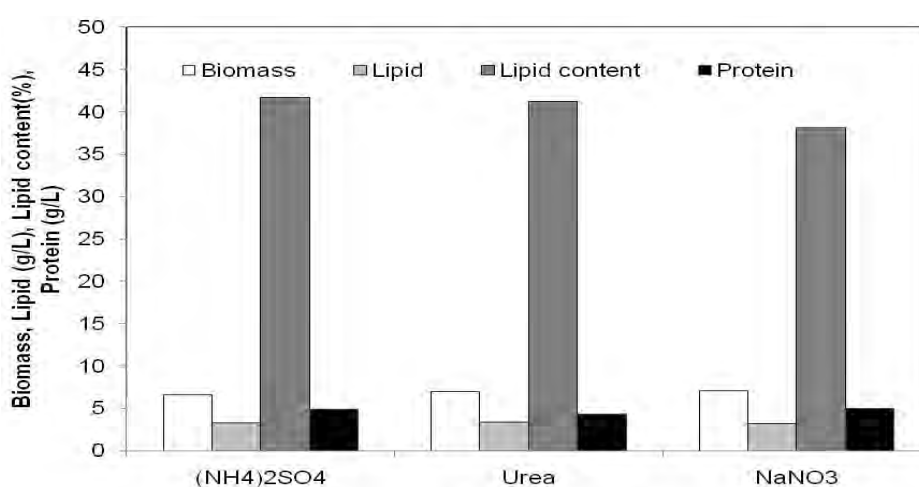
การสังเคราะห์ลิปิดของจุลินทรีย์จะเกิดได้ดีเมื่อมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในสภาวะที่มีคาร์บอนมากเกินไปและจำกัดปริมาณไนโตรเจน ซึ่งจะส่งผลเสริมการสร้าง acetyl-CoA เมื่อปริมาณไนโตรเจนจำกัดเซลล์จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ AMP deaminase เพิ่มขึ้นเป็น 5 เท่าของการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีการจำกัดไนโตรเจน การเพิ่มกิจกรรมของ AMP deaminase จะลดการสะสมของ AMP ภายในเซลล์และในไมโตรคอนเดรีย การลดลงของ AMP ในไมโตรคอนเดรียจะไปยับยั้งหรือหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นกับปริมาณของ AMP ผลที่ได้คือ isocitrate จะไม่ถูกเปลี่ยนแต่จะสะสมภายในไมโตรคอนเดรียในรูปของ citrate จากนั้น citrate จะถูกส่งไปสู่อิซอซิเตรพลาสซึมและถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate ด้วยเอนไซม์ ATP:citrate lyase (ACL) และ acetyl-CoA จะถูกนำไปสังเคราะห์กรดไขมัน (Ratledge, 2004)

4.2.5 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80 g/L และแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนคือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ยูเรีย และ NaNO_3 ที่ความเข้มข้น 0.1 g/L ปริมาตรอาหาร 50 mL ในฟลasks ขนาด 250 mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน พบว่าเมื่อยีสต์เจริญในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และยูเรีย เซลล์ให้ปริมาณลิปิดไม่แตกต่างกันมากนัก โดยให้ปริมาณลิปิด 3.34, 3.35 g/L ตามลำดับ และอัตราการผลิตเท่ากันที่ 0.42g/L/d ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน เซลล์ให้ลิปิด 3.20 g/L และอัตราการผลิตลิปิดที่ 0.40g/L/d ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 และตารางที่ 4.6

การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L พบว่าในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และยูเรีย ได้ปริมาณเซลล์และลิ

ปิดไม่แตกต่างกันมากนัก โดยได้ปริมาณเซลล์ 6.58, 6.95g/L และอัตราการผลิตเซลล์ 0.82, 0.87g/L/d ตามลำดับ และเซลล์ให้ปริมาณลิปิด 3.34g/L (41.72%DCW), 3.35g/L (41.26%DCW) เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ส่วนอัตราการผลิตลิปิดเท่ากันที่ 0.42g/L/d เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ปริมาณเซลล์ 7.13g/L อัตราการผลิตเซลล์ 0.89g/L/d ปริมาณลิปิด 3.20g/L (38.16%DCW) อัตราการผลิตปริมาณ 0.40g/L/d ผลการศึกษพบว่าอินทรีย์ไนโตรเจน (ยูเรีย) ส่งเสริมการเจริญได้ดีกว่าอินทรีย์ไนโตรเจน ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3) ดังนั้นจากการศึกษาวิจัยนี้จึงเลือก $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 4.13 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ ปริมาณลิปิดและโปรตีนของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ตารางที่ 4.6 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน (0.1g/L) ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

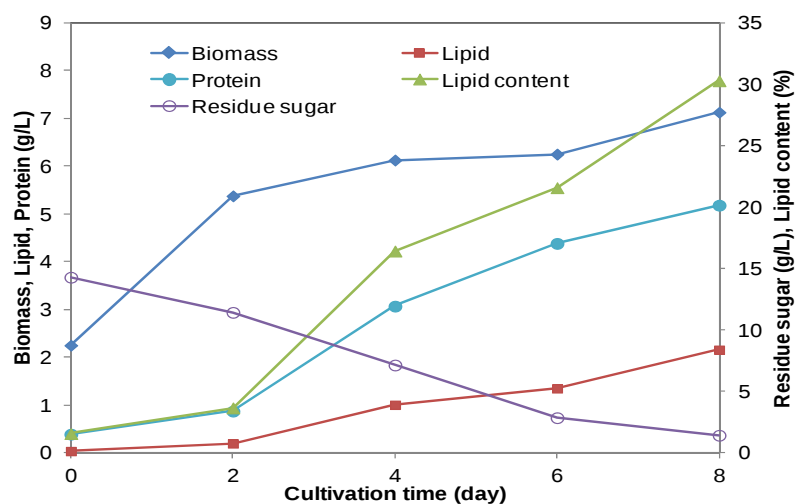
ไนโตรเจน	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Qx (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.58	4.89	3.34	41.72	0.82	0.42
Urea	6.95	4.38	3.35	41.26	0.87	0.42
NaNO_3	7.13	4.96	3.20	38.16	0.89	0.40

4.2.6 ผลของปริมาณกลูโคส

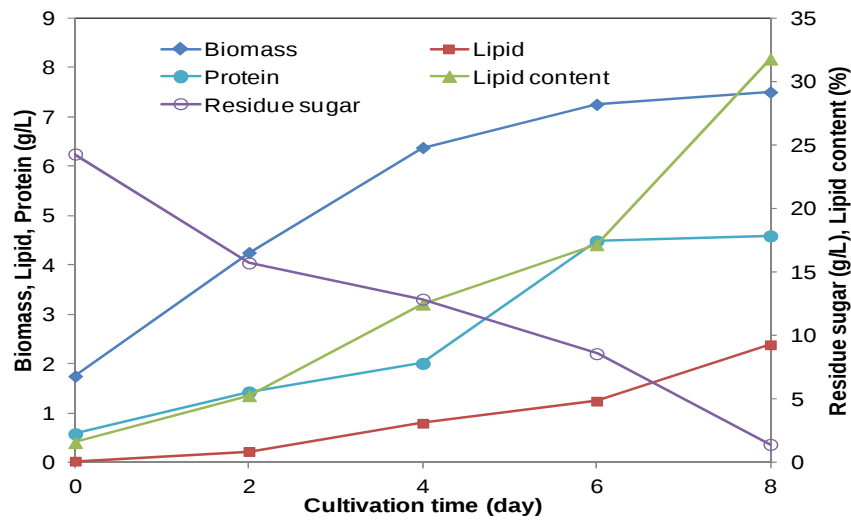
การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการคงที่ปริมาณของอนินทรีย์ไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 0.1 g/L และแปรผันปริมาณกลูโคสที่ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g/L ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลาสก์ 250mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน จากการศึกษพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเริ่มต้น 80 g/L เซลล์ให้ปริมาณลิกปิดสูงสุดที่ 4.16 g/L หรือ 45.73%DCW อัตราการผลิตลิกปิด 0.52g/L/d ส่วนกลูโคสที่ 20g/L ให้ปริมาณลิกปิดต่ำสุดที่ 2.36g/L และอัตราการผลิตลิกปิด 0.30g/L/d ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.14-4.22 และตารางที่ 4.7

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสโดยคงที่ปริมาณของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เซลล์ให้ปริมาณลิกปิดสูงสุดที่ 4.16g/L (45.73%DCW) อัตราการผลิตลิกปิด 0.52g/L/d เมื่อกลูโคส 60g/L ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 9.05g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.13g/L/d ปริมาณลิกปิด 3.02g/L(33.36%DCW) อัตราการผลิตลิกปิด 0.38g/L/d เมื่อกลูโคสเริ่มต้น 20, 30, 40, 50, 70, 80, 90, 100g/L ให้ปริมาณเซลล์ 7.31, 7.69, 8.79, 8.69, 8.28, 8.81, 8.44, 8.71g/L อัตราการผลิตเซลล์ 0.91, 0.96, 1.10, 1.09, 1.04, 1.10, 1.06, 1.09g/L/d ตามลำดับ ส่วนปริมาณลิกปิด 2.36g/L(32.16%DCW), 2.40g/L (31.19%DCW), 2.80g/L (32.01%DCW), 2.97g/L (43.24%DCW), 3.02g/L (33.36%DCW), 3.08g/L (37.24%DCW), 3.53g/L(41.95%DCW), 3.58g/L(41.12%DCW) และอัตราการผลิตลิกปิด 0.30, 0.30, 0.35, 0.37, 0.38, 0.39, 0.44, 0.45g/L/d เมื่อกลูโคสเริ่มต้น 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 100g/L ตามลำดับ โดยที่มีกลูโคสต่ำจะมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่ำ และปริมาณกลูโคสสูงค่า C/N ratio สูง ซึ่งจากผลการศึกษาวิจัยที่ได้สอดคล้องกับผลวิจัยของ Turcotte and Kosaric (1989) ที่รายงานว่ายีสต์ *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่า C/N ratio เท่ากับ 77 ให้ผลผลิตลิกปิดสูงสุด ยีสต์ *R. toruloides* มีการสะสมลิกปิดภายในเซลล์สูงถึง 76% ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร (Li et al, 2006) โดยเมื่ออัตราส่วนของปริมาณ C/N ratio ต่ำ หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงนั้นเชื้อจะมีการเจริญหรือเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าการสร้างลิกปิด แต่ในช่วงของการผลิตลิกปิดเซลล์ต้องการคาร์บอนสูงเพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นลิกปิดจึงต้องการอัตราส่วนของปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง การกวดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนหรือที่ค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงนั้นเซลล์จะลดการ

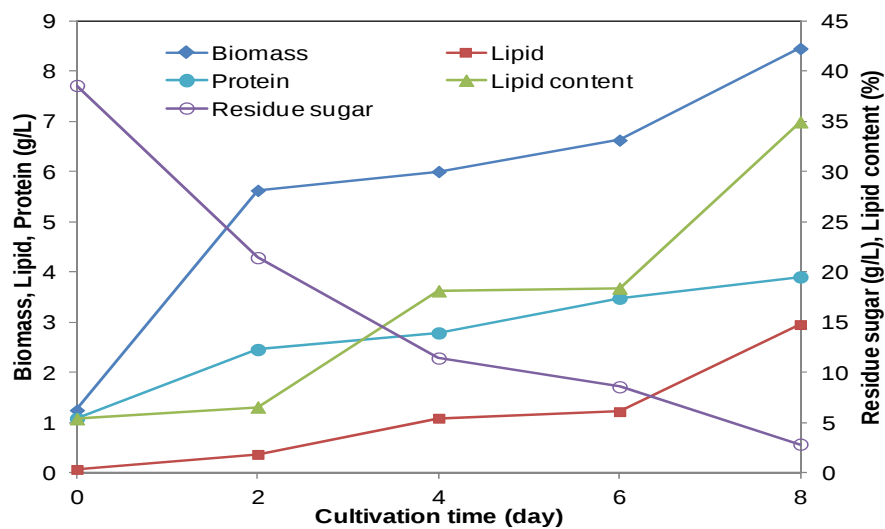
ใช้ NADPH ในการสร้างโปรตีนหรือการเจริญและเมื่อมีการสะสม NADPH มากขึ้นจะทำให้เซลล์เข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ลิปิดสูงขึ้น (Turcotte and Kosaric, 1989; Hassan et al., 1996; Yamane et al., 1997) Papanikolaou et al. (2004) ซึ่งสรุปว่าค่า C/N ratio ต่ำหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนสูงและปริมาณกลูโคสต่ำนั้นเหมาะต่อการเจริญหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ในช่วงของการผลิตลิปิดนั้นเซลล์ต้องการคาร์บอนสูงเพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นลิปิดจึงต้องการกลูโคสสูง ยีสต์ *Lipomyces starkeyi* เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C/N ratio ที่ 150 เซลล์สะสมลิปิดสูงที่ 68%DCW ในขณะที่ C/N ratio ที่ 60 เซลล์สะสมลิปิดเพียง 40%DCW (Angerbauer et al., 2008) และได้ศึกษาศักยภาพในการสะสมลิปิดของยีสต์ *Lipomyces starkeyi* เมื่อเจริญในน้ำเสีย (sewage sludge) พบว่าการสะสมลิปิดจะขึ้นอยู่กับการอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N-ratio) โดย C/N-ratio 150 และ pH 5.0 จะมีปริมาณลิปิดสูงสุด 68% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนผลการศึกษาในยีสต์ไอโซเลท YU5/2 พบว่าปริมาณลิปิดเพิ่มขึ้นตามปริมาณการเพิ่มของกลูโคส และเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสสูงสุดที่ 90, 100 g/L พบว่ามีอัตราการเจริญและผลิตลิปิดลดลงอาจเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำไม่เพียงพอต่อการส่งเสริมการเจริญอีกทั้งยังอาจมีผลของการยับยั้งการเจริญเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสที่สูงเกินไป เช่น การเจริญและผลิตลิปิดของยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* Y4 ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสสูงกว่า 120 g/L (Li et al., 2007)



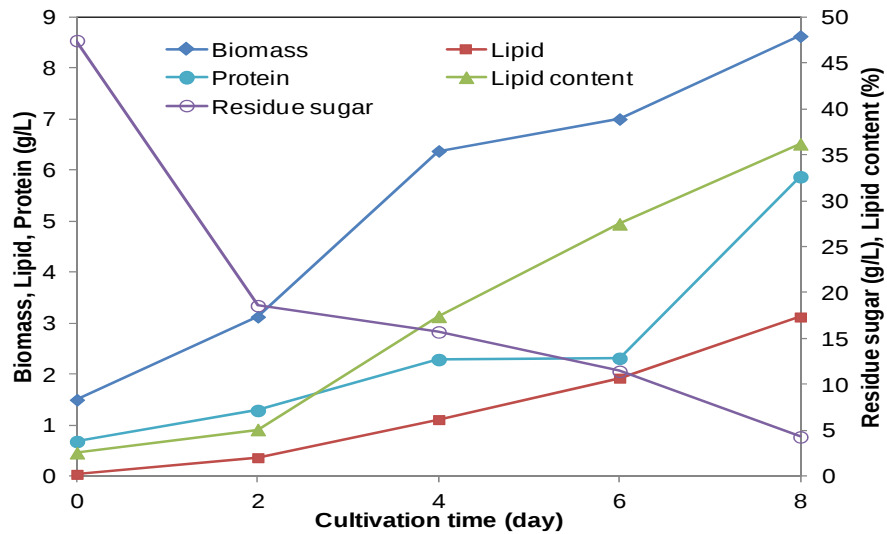
รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิปิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 20g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



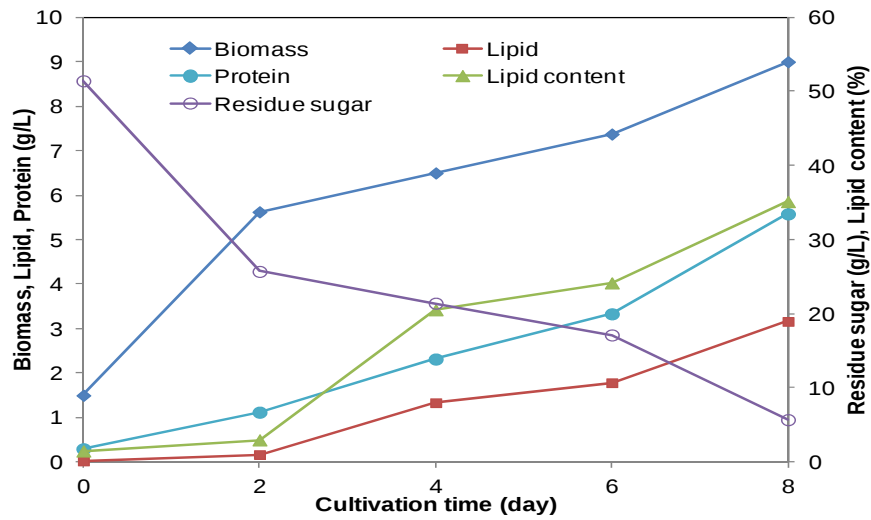
รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 30g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



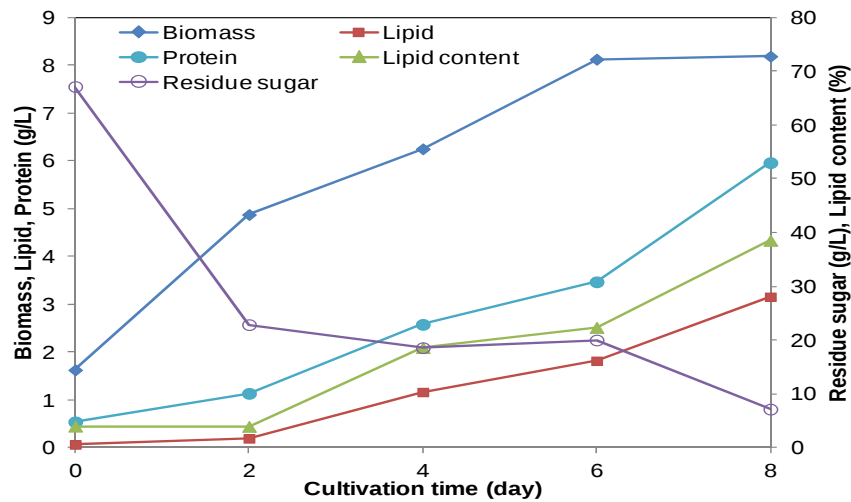
รูปที่ 4.16 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิพิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 40g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



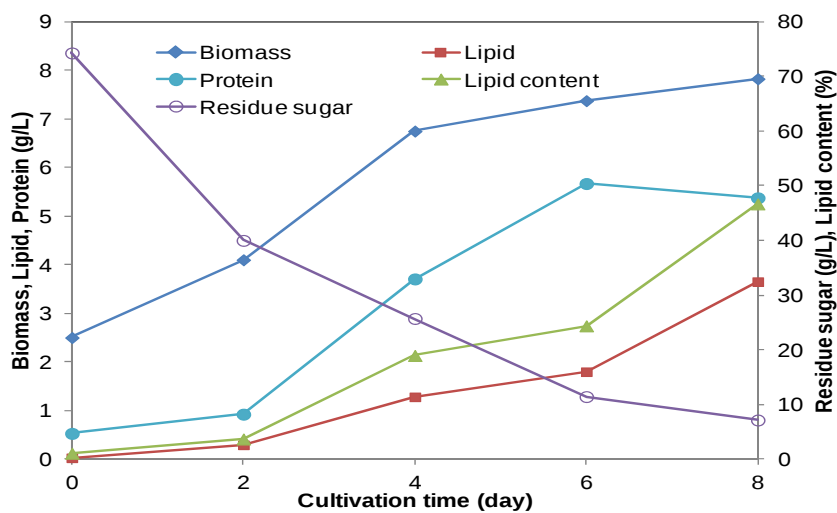
รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิปิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 50g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



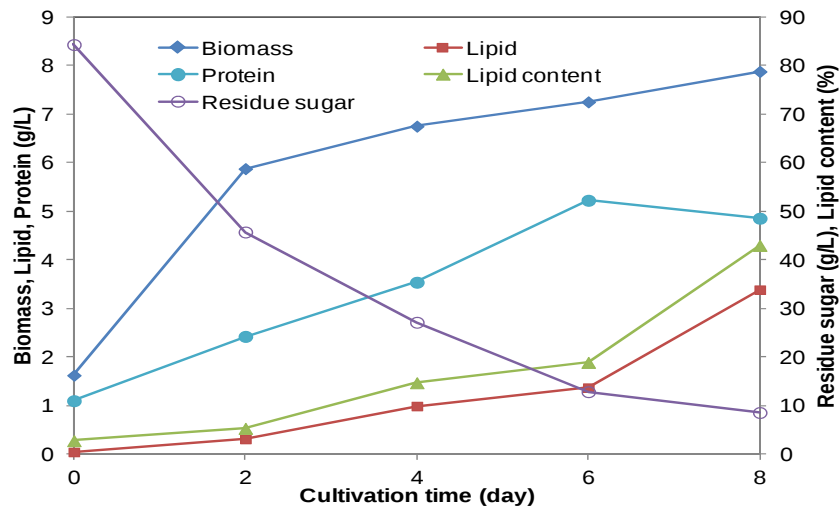
รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิปิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 60g/L เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



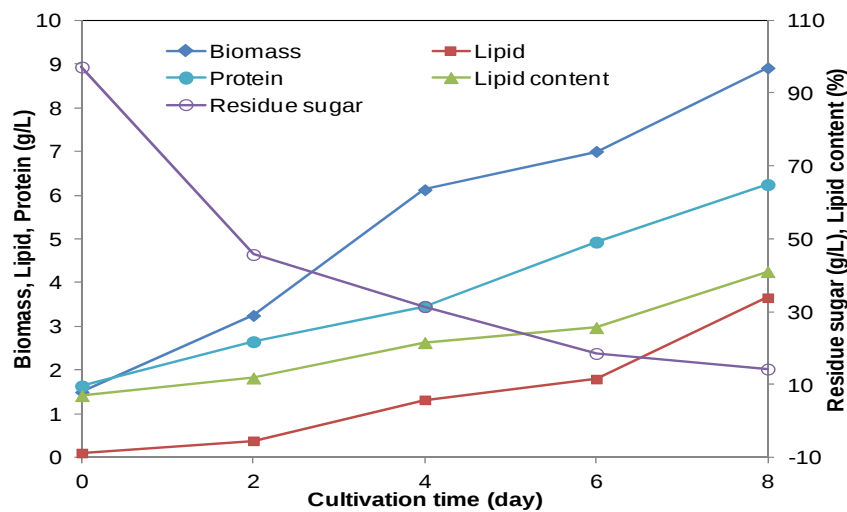
รูปที่ 4.19 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิปิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 70g/L เป็นแหล่งคาร์บอน ปั่นแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30 °C เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 4.20 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) ลิปิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L เป็นแหล่งคาร์บอน ปั่นแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30 °C เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 4.21 แสดงปริมาณมวลเซลล์ (biomass) ลิปิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 90g/L เป็นแหล่งคาร์บอน ปั่นแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 4.22 ปริมาณมวลเซลล์ (Biomass) ลิปิด (lipid, lipid content) โปรตีน (protein) น้ำตาลรีดิวซ์ (residue sugar) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 100g/L เป็นแหล่งคาร์บอน ปั่นแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ตารางที่ 4.7 ผลของปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสต่อการเจริญ (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) อัตราการผลิตเซลล์ (Q_x) และอัตราการผลิตลิปิด (Lipid production rate) ของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน

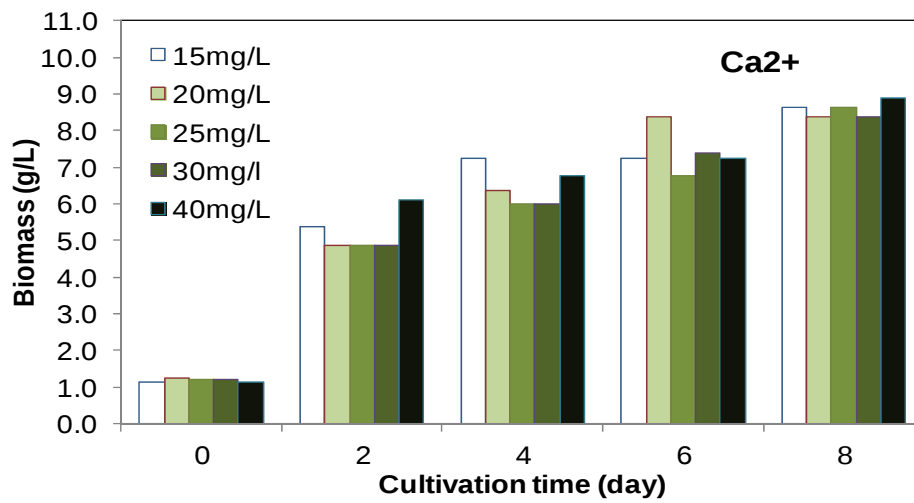
กลูโคส (g/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (% DCW)	Q_x (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
20	7.31	4.25	2.36	32.16	0.91	0.30
30	7.69	4.59	2.40	31.19	0.96	0.30
40	8.79	4.90	2.80	32.01	1.10	0.35
50	8.69	5.15	2.97	34.24	1.09	0.37
60	9.05	5.25	3.02	33.36	1.13	0.38
70	8.28	5.18	3.08	37.24	1.04	0.39
80	8.81	4.59	4.16	45.73	1.10	0.52
90	8.44	4.73	3.53	41.95	1.06	0.44
100	8.71	4.92	3.58	41.12	1.09	0.45

4.2.7 ผลของชนิดและปริมาณของอิออนบวก

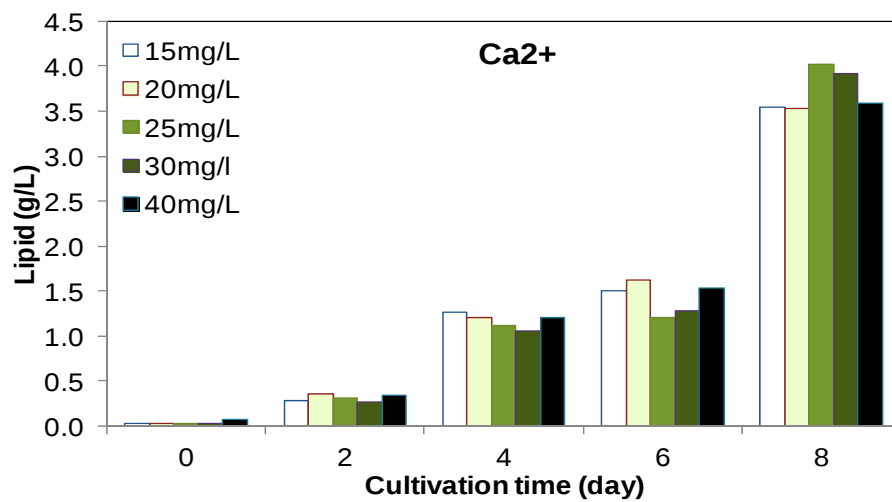
4.2.7.1 ปริมาณของ Ca^{2+}

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/L ที่ pH 5.0 ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลasks ขนาด 250mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน แปรผันปริมาณ Ca^{2+} (CaCl_2) ที่ 15, 20, 25, 30, 40 mg/L ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.23-4.24 และตารางที่ 4.8

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อยีสต์เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Ca^{2+} 25 mg/L เซลล์ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.86 g/L (44.7%DCW) อัตราการผลิตลิปิด 0.48g/L/d ในขณะที่เมื่อใช้ Ca^{2+} 15, 20, 30, 40mg/L ได้ปริมาณลิปิด 3.40g/L (39.47%DCW), 3.39g/L (40.46%DCW), 3.75g/L (44.81%DCW), 3.45g/L (38.82%DCW) อัตราการผลิตลิปิด 0.43, 0.42, 0.47, 0.43g/L/d ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญพบว่าไม่แตกต่างกันมากนักโดยให้ปริมาณเซลล์ 8.63, 8.38, 8.36, 8.88g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.08, 1.05, 1.08, 1.05, 1.11g/L/d เมื่อมี Ca^{2+} 12, 20, 25, 30, 40mg/L ตามลำดับ



รูปที่ 4.23 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง (biomass) เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^{2+}) ที่ 15, 20, 25, 30, 40 mg/L บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30 °C เป็นเวลา 8 วัน



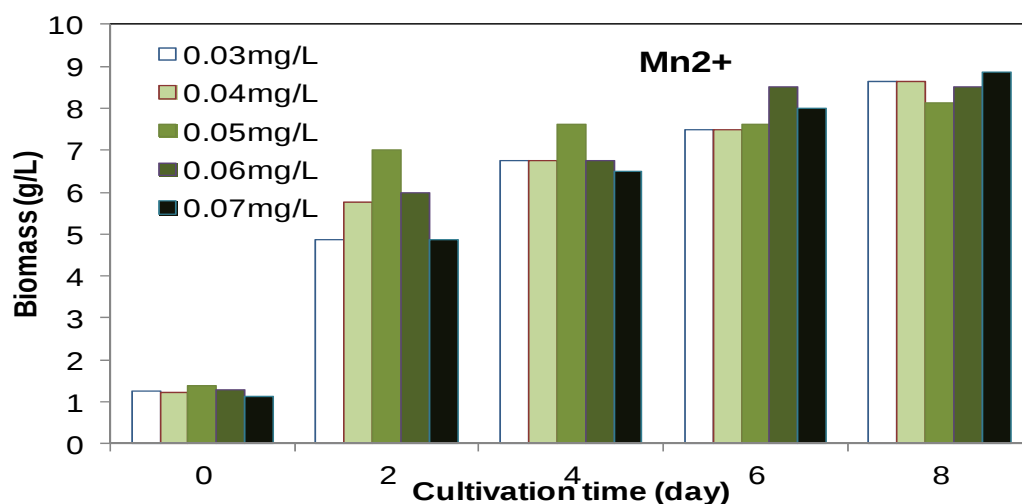
รูปที่ 4.24 เปรียบเทียบปริมาณลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^{2+}) ที่ 15, 20, 25, 30, 40 mg/L บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30 °C เป็นเวลา 8 วัน

ตารางที่ 4.8 ผลของ Ca^{2+} ต่อการเจริญ ปริมาณลิตปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU 5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

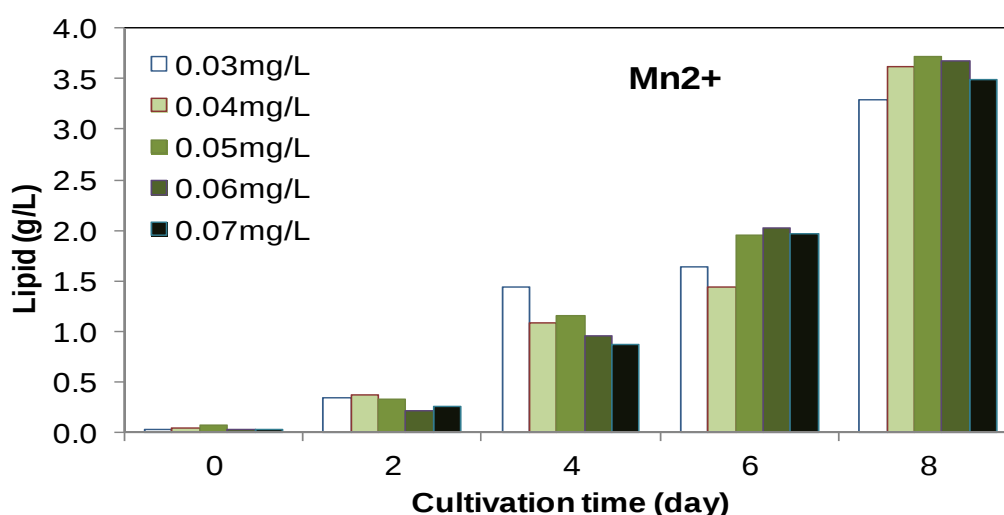
ปริมาณ Ca^{2+} (mg/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Q_x (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
15	8.63	4.32	3.40	39.47	1.08	0.43
20	8.38	4.52	3.39	40.46	1.05	0.42
25	8.63	4.42	3.86	44.71	1.08	0.48
30	8.38	4.94	3.75	44.81	1.05	0.47
40	8.88	4.56	3.45	38.82	1.11	0.43

4.2.7.2 ปริมาณของ Mn^{2+}

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80 g/L ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลasks ขนาด 250mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน แปรผันปริมาณ MnCl_2 ระหว่าง 0.03–0.07 mg/L ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.25–4.26 และตารางที่ 4.9



รูปที่ 4.25 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ MnCl_2 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 4.26 เปรียบเทียบการผลิตลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ $MnCl_2$ ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน

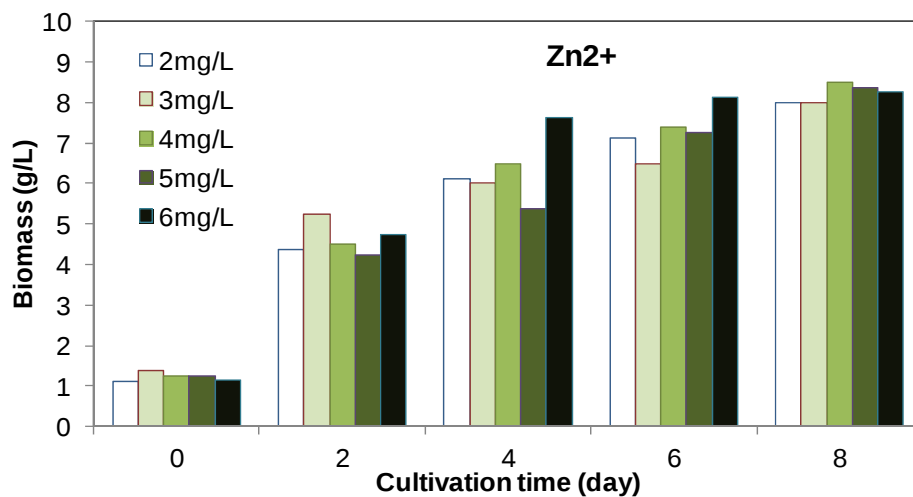
ตารางที่ 4.9 ผลของ Mn^{2+} ต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ปริมาณ Mn^{2+} (mg/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Q_x (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
0.03	8.63	5.29	3.15	36.52	1.08	0.39
0.04	8.38	4.42	3.22	38.41	1.05	0.40
0.05	8.13	5.13	3.56	43.81	1.02	0.45
0.06	8.50	4.84	3.52	41.38	1.06	0.44
0.07	8.88	4.92	3.34	37.67	1.11	0.42

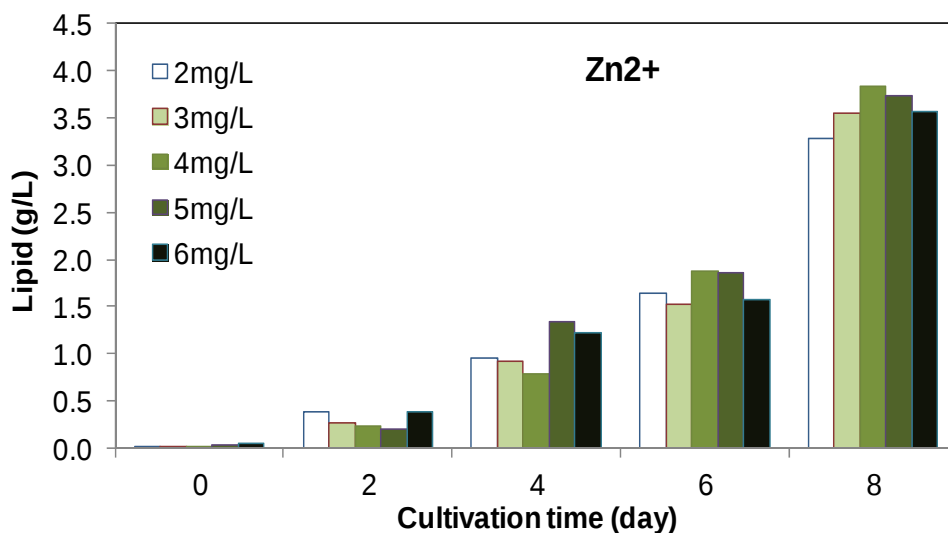
จากรูปที่ 4.25–4.26 และตารางที่ 4.9 พบว่าเมื่อยีสต์เจริญในอาหารที่มี Mn^{2+} 0.05mg/L ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.56 g/L (43.81%DCW) อัตราการผลิตลิปิด 0.45g/L/d ในขณะที่ Mn^{2+} 0.03, 0.04, 0.06, 0.07mg/L ได้ปริมาณลิปิด 3.15g/L (36.52%DCW), 3.22g/L (38.41%DCW), 3.52g/L(41.38%DCW), 3.34g/L (37.67%DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.39, 0.40, 0.44, 0.42g/L/d ตามลำดับ ส่วนการเจริญของเซลล์ไม่แตกต่างกันมากนักที่ 8.63, 8.38, 8.13, 8.50, 8.88g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.08, 1.05, 1.02, 1.06, 1.11g/L/d ตามลำดับ

4.2.7.3 ปริมาณของ Zn^{2+}

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80 g/L ปริมาตรอาหาร 50 mL ในฟลasks ขนาด 250 mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน แปรผันปริมาณ $\text{ZnSO}_4 (\text{Zn}^{2+})$ ระหว่าง 2.0–6.0 mg/L ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.27 และตารางที่ 4.10



รูปที่ 4.27 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ $\text{ZnSO}_4 (\text{Zn}^{2+})$ ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 4.28 เปรียบเทียบปริมาณลิพิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ $\text{ZnSO}_4 (\text{Zn}^{2+})$ ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

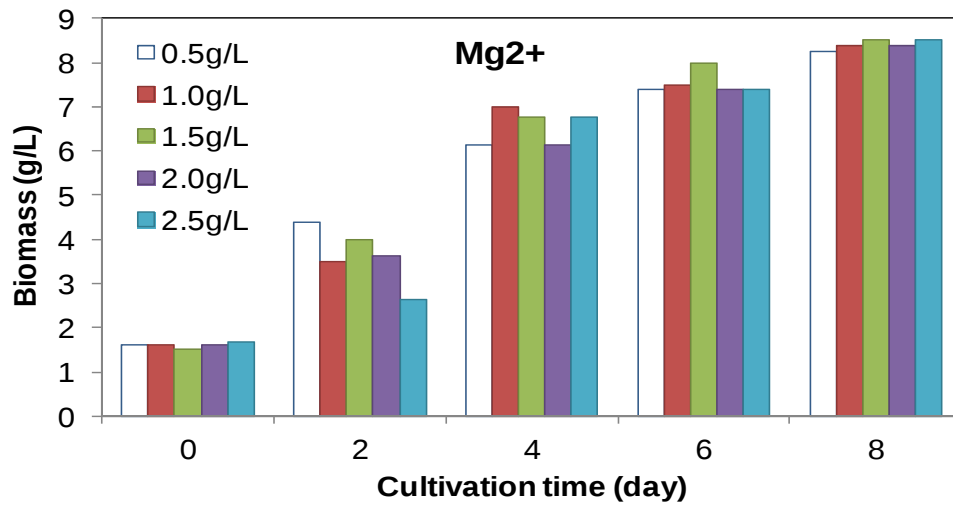
ตารางที่ 4.10 ผลของ Zn^{2+} ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ปริมาณ Zn^{2+} (mg/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Q_x (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
2.0	8.38	4.84	3.19	38.11	1.05	0.40
3.0	8.00	5.32	3.40	42.55	1.00	0.43
4.0	8.50	5.15	3.67	43.18	1.06	0.46
5.0	8.63	4.87	3.57	41.41	1.08	0.45
6.0	8.38	5.37	3.34	39.92	1.05	0.42

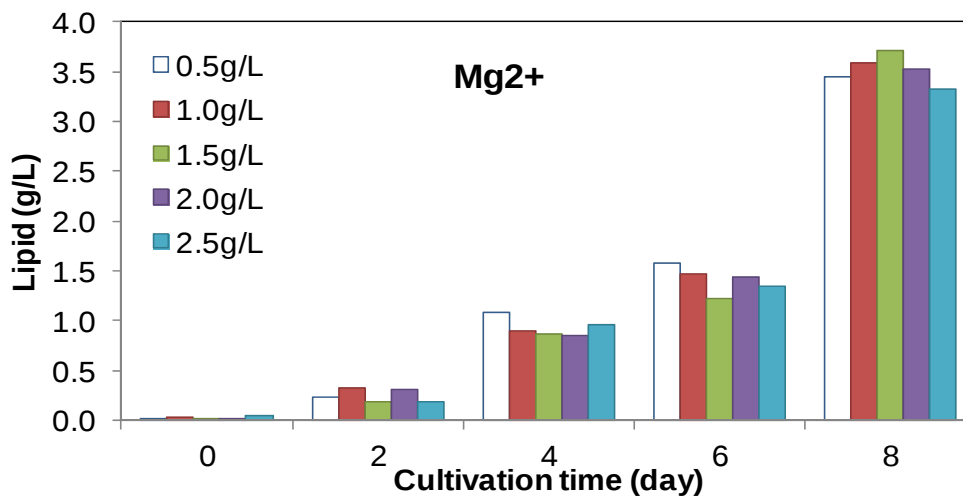
จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Zn^{2+} 4.0mg/L ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.56g/L (43.81%DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.46g/L/d เมื่อความเข้มข้นของ $ZnSO_4$ (Zn^{2+}) เท่ากับ 2.0, 3.0, 5.0, 6.0, 7.0mg/L ได้ปริมาณลิปิด 3.19g/L (38.11%DCW), 3.40g/L (42.55%DCW), 3.57g/L (41.41%DCW), 3.34g/L (39.92%DCW) และอัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 0.40, 0.43, 0.46, 0.45, 0.42g/L/d ตามลำดับ อัตราการเจริญของเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยมีปริมาณเซลล์ 8.38, 8.00, 8.50, 8.63, 8.38g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.05, 1.00, 1.06, 1.08, 1.05g/L/d เมื่อมี $ZnSO_4$ (Zn^{2+}) 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0mg/L ตามลำดับ

4.2.7.4 ปริมาณของ Mg^{2+}

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80 g/L ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลasks ขนาด 250mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน แปรผันปริมาณ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ระหว่าง 0.5–2.5 g/L ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.29–4.30 และตารางที่ 4.11 โดยพบว่าเมื่อยีสต์เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mg^{2+} 1.5g/L ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.65g/L (42.91%DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.46g/L/d เมื่อปริมาณ Mg^{2+} ที่ 0.5, 1.0, 2.0, 2.5mg/L ปริมาณลิปิด 3.29g/L(38.69%DCW), 3.44g/L(41.11%DCW), 3.38g/L(40.33%DCW), 3.18g/L (37.47%DCW) ส่วนการเจริญไม่แตกต่างกันโดยให้ปริมาณเซลล์ 8.50, 8.38, 8.38, 8.50g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.06, 1.05, 1.07, 1.05, 1.06g/L/d เมื่อเจริญในอาหารที่มี Mg^{2+} 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5mg/L ตามลำดับ



รูปที่ 4.29 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน



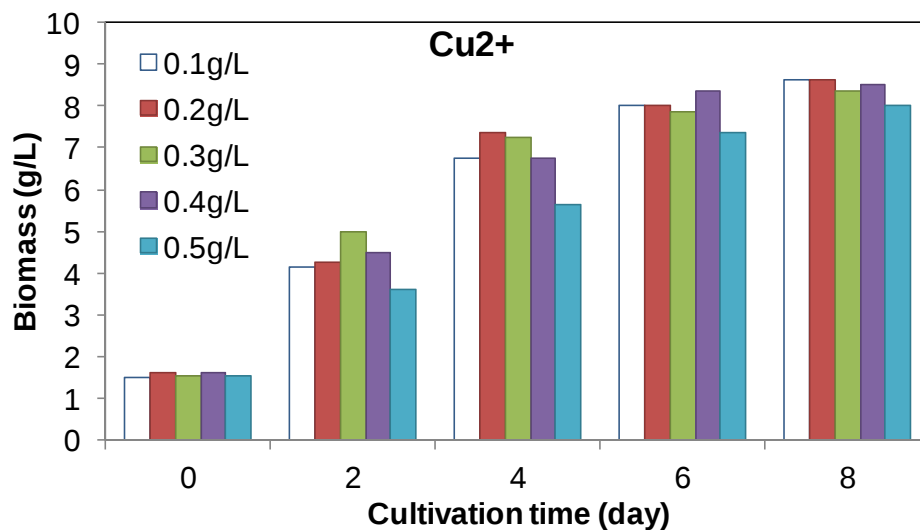
รูปที่ 4.30 เปรียบเทียบปริมาณลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน

ตารางที่ 4.11 ผลของ Mg^{2+} ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

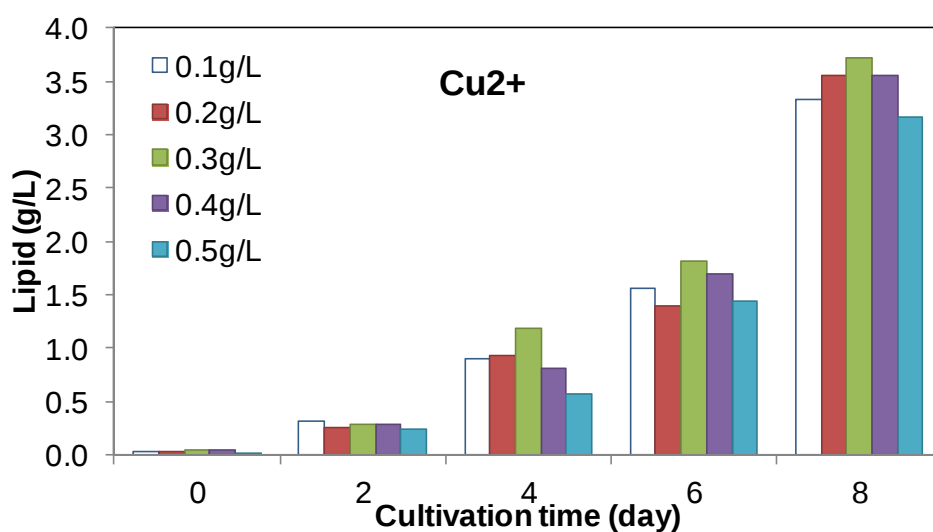
ปริมาณ Mg^{2+} (g/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	QX (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
0.5	8.50	4.48	3.29	38.69	1.06	0.41
1.0	8.38	4.87	3.44	41.11	1.05	0.43
1.5	8.50	4.55	3.65	42.91	1.06	0.46
2.0	8.38	4.74	3.38	40.33	1.05	0.42
2.5	8.50	5.19	3.18	37.47	1.06	0.40

4.2.7.5 ปริมาณของ Cu^{2+}

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80 g/L ปริมาตรอาหาร 50 mL ในฟลasks ขนาด 250 mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน แปรผันปริมาณ $CuSO_4$ ระหว่าง 0.1–0.5 mg/L ผลการศึกษาดังรูปที่ 4.31–4.32 และตารางที่ 4.12



รูปที่ 4.31 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ $CuSO_4$ ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 4.32 เปรียบเทียบปริมาณลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ CuSO_4 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

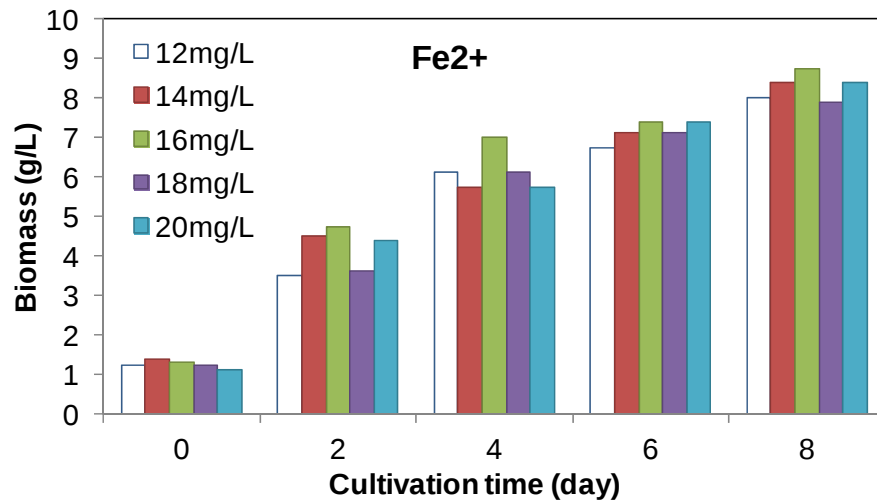
ตารางที่ 4.12 ผลของ Cu^{2+} ต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ปริมาณ Cu^{2+} (mg/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Q_x (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
0.1	8.63	4.57	3.20	37.05	1.08	0.40
0.2	8.63	4.69	3.40	39.47	1.08	0.43
0.3	8.38	5.08	3.56	42.54	1.05	0.45
0.4	8.88	4.62	3.52	39.67	1.11	0.44
0.5	8.00	4.92	3.04	37.95	1.00	0.38

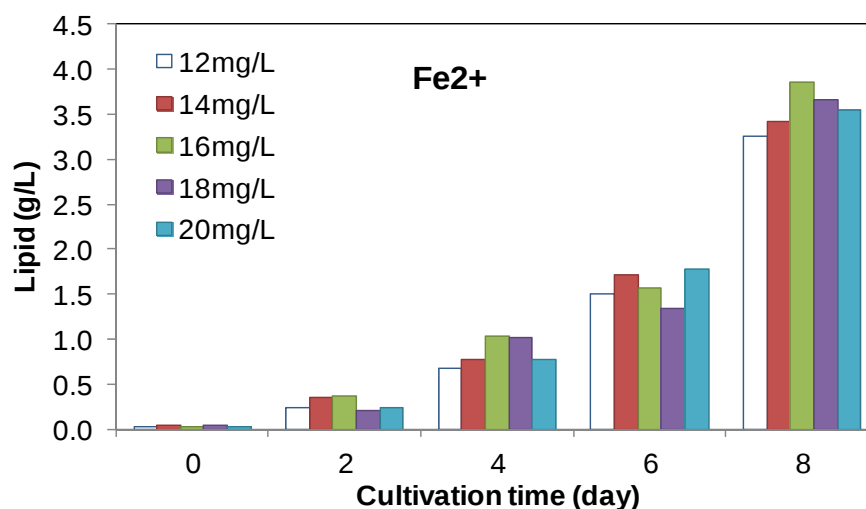
จากรูปที่ 4.31–4.32 และตารางที่ 4.12 พบว่าเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Cu^{2+} 0.3 mg/L ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.56 g/L (42.54%DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.45g/L/d ส่วนเมื่อปริมาณ Cu^{2+} 0.1, 0.2, 0.4, 0.5mg/L ได้ลิปิด 3.20g/L (37.05%DCW), 3.40g/L (39.47%DCW), 3.52g/L (39.67%DCW), 3.04g/L (37.95%DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.40, 0.43, 0.44, 0.38g/L/d ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญไม่แตกต่างกันโดยมีปริมาณเซลล์ 8.63, 8.63, 8.38, 8.88, 8.00g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.08, 1.08, 1.05, 1.11, 1.00g/L/d เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Cu^{2+} 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/L ตามลำดับ

4.2.7.6 ปริมาณของ Fe^{2+}

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80 g/L ปริมาตรอาหาร 50mL ในฟลasks ขนาด 250mL บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน คงที่ปริมาณ แปรผันปริมาณ $\text{FeSO}_4 (\text{Fe}^{3+})$ ระหว่าง 12–20 mg/L ผลการศึกษาดังรูป 4.33–4.34 และตารางที่ 4.13



รูปที่ 4.33 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ FeSO_4 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 4.34 เปรียบเทียบปริมาณลิปิดเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะที่มีกลูโคส 80g/L แปรผันปริมาณ FeSO_4 ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ตารางที่ 4.13 ผลของ Fe^{2+} ต่อการเจริญ ปริมาณลิปิด อัตราการผลิตเซลล์และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

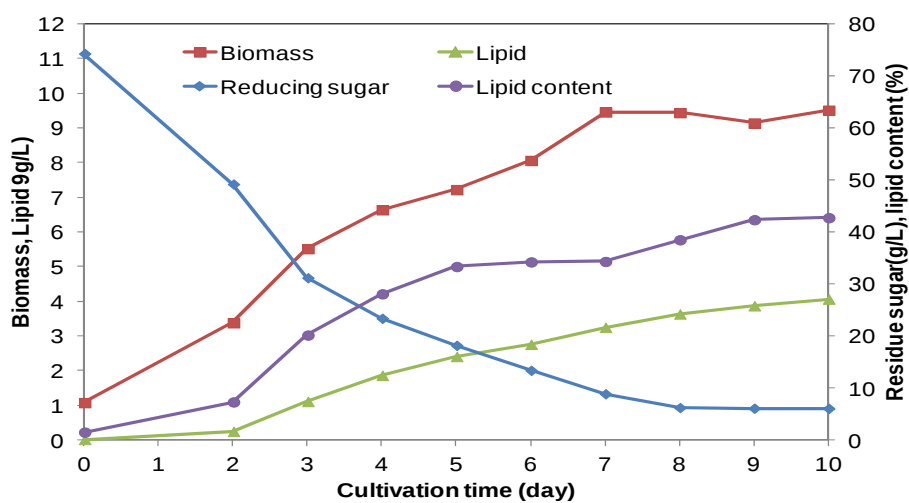
ปริมาณ Fe^{2+} (mg/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Q_x (g/L/d)	Lipid production rate (g/L/d)
12	8.50	4.68	2.99	35.23	1.06	0.37
14	8.25	4.87	3.16	38.26	1.03	0.40
16	8.75	4.96	3.70	42.24	1.09	0.46
18	7.88	4.82	3.50	44.48	0.99	0.44
20	8.38	4.59	3.40	40.60	1.05	0.43

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อยีสต์เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณ Fe^{2+} 18 mg/L ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.50 g/L (44.48%DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.44g/L/d ส่วนปริมาณ Fe^{2+} 12, 14, 16, 20mg/L ได้ปริมาณลิปิด 2.00g/L (35.23%DCW), 3.16g/L(38.26%DCW), 3.70g/L(42.24%DCW), 3.40g/L(40.60%DCW) และอัตราการผลิตลิปิด 0.37, 0.40, 0.44, 0.43g/L/d ตามลำดับ การเจริญของเซลล์ต่ำสุดที่ 7.88g/L อัตราการผลิตเซลล์ 0.99g/L/d เมื่อปริมาณ Fe^{2+} 18mg/L และปริมาณเซลล์ 8.50, 8.25, 8.75, 8.38g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.06, 1.03, 1.09, 1.05g/L/d เมื่อปริมาณ Fe^{2+} 12, 14, 16, 20mg/l ตามลำดับ

จากการศึกษาถึงสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและสะสมลิปิดของยีสต์ไขมันสูงไอโซเลท YU5/2 พบว่าอุณหภูมิ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณกลูโคส ปริมาณไนโตรเจนเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตและสะสมลิปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 โดยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตลิปิดดังนี้คือ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้น 5.0 บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 8 วัน ปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/L, ปริมาณกลูโคส 80 g/L, และปริมาณอิออนบวกที่เหมาะสมคือ Ca^{2+} 25 mg/L, Mn^{2+} 0.05 mg/L, Zn^{2+} 4.0 mg/L, Mg^{2+} 1.5 g/L, Cu^{2+} 0.3 mg/L, Fe^{2+} 18 mg/L โดยเซลล์ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 44.48% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นการศึกษาในระดับขยายขนาดในถังหมักด้วยการหมักแบบกะและแบบกะป้อนจะศึกษาภายใต้สภาวะที่ได้จากการทดลองดังกล่าว

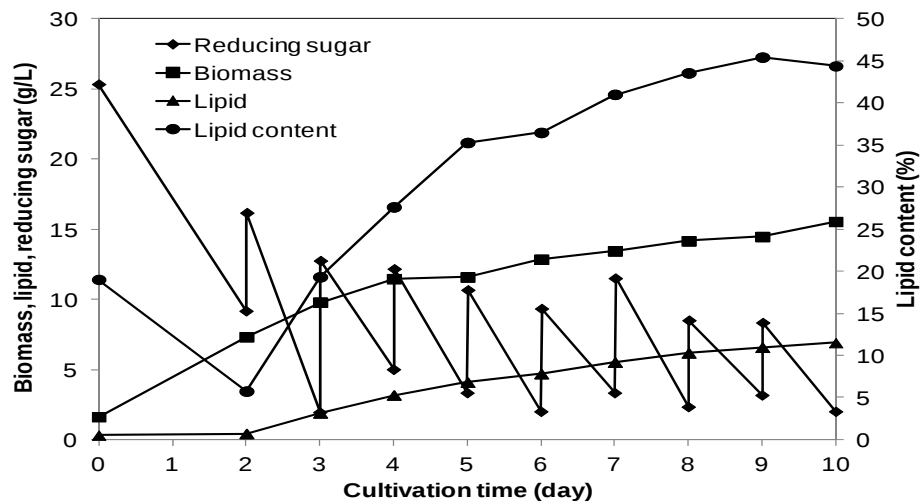
4.3 การศึกษาการผลิตลิปิดด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกะป้อน

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80 g/L ที่มี pH เริ่มต้น 5.0 ปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/L, Ca^{2+} 25 mg/L, Mn^{2+} 0.05 mg/L, Zn^{2+} 4.0 mg/L, Mg^{2+} 1.5 g/L, Cu^{2+} 0.3 mg/L, Fe^{2+} 18 mg/L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรทำงาน 1.5 ลิตร บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 10 วัน ผลการทดลองดังรูปที่ 4.35



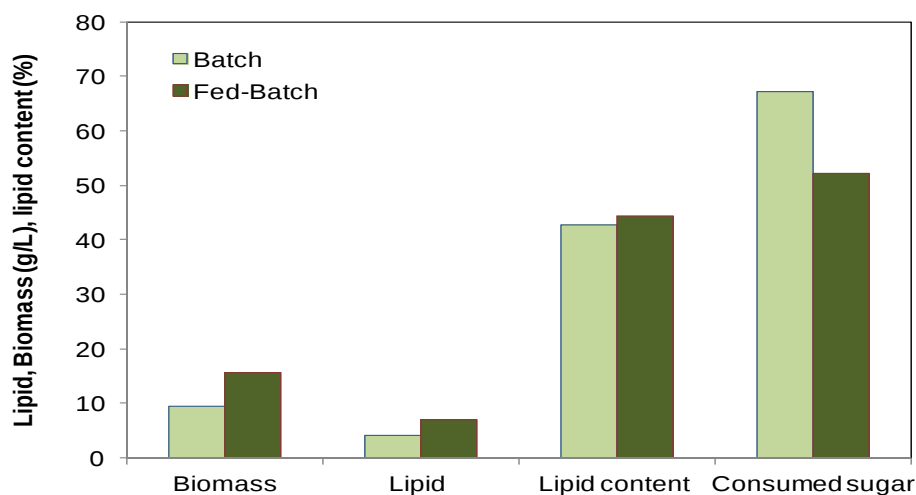
รูปที่ 4.35 ปริมาณเซลล์ (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ ด้วยการหมักแบบกะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเริ่มต้น 80g/L บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 10 วัน

ศึกษาการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะป้อน (fed-batch fermentation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 30 g/L ที่มี pH เริ่มต้น 5.0 ปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/L ปริมาณอิออน Ca^{2+} 25 mg/L, Mn^{2+} 0.05 mg/L, Zn^{2+} 4.0 mg/L, Mg^{2+} 1.5 g/L, Cu^{2+} 0.3 mg/L, Fe^{2+} 18 mg/L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรทำงาน 1.5 ลิตร บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 10 วัน ควบคุมระบบโดยการเติมน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 100% (1.0g/mL) ในวันที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ของการหมัก ผลการทดลองดังรูปที่ 4.36



รูปที่ 4.36 ปริมาณเซลล์ (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid, lipid content) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ ด้วยการหมักแบบกะป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเริ่มต้น 30g/L และเติมสารละลายกลูโคสตามระยะต่างๆ ของการหมัก 30°C เป็นเวลา 10 วัน

จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณเซลล์ที่ได้จากการหมักแบบกะป้อนสูงกว่าการหมักแบบกะ โดยแบบกะป้อนได้ปริมาณเซลล์ 15.54g/L ปริมาณลิปิด 6.9g/L ในขณะที่การหมักแบบกะได้ปริมาณเซลล์ 9.51g/L ปริมาณลิปิด 4.06g/L ผลดังรูปที่ 4.37 และตารางที่ 4.14



รูปที่ 4.37 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ ปริมาณลิปิด และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ในระหว่างการเจริญของการเพาะเลี้ยงยีสต์ YU 5/2 ด้วยการหมักแบบกะและกะป้อน 30°C เป็นเวลา 10 วัน

ตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบปริมาณเซลล์แห้ง ปริมาณลิปิด ปริมาณน้ำตาลที่ใช้เพื่อการเจริญ อัตราการผลิตเซลล์ (Q_x) และอัตราการผลิตลิปิด (Lipid production rate) ของยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะและแบบกะป้อน

Parameters	Cultivation	
	Batch	Fed-Batch
Biomass (g/L)	9.51	15.54
Lipid (g/L)	4.06	6.90
Lipid content (%DCW)	42.73	44.38
Consumed sugar (g/L)	67.14	52.18
Q_x (g/L/d)	0.95	1.55
Lipid production rate (g/L/d)	0.406	0.689

การศึกษากการผลิตลิปิดจากยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกะป้อน จะเห็นว่าปริมาณเซลล์ที่ได้จากการหมักแบบกะป้อนสูงกว่าการหมักแบบกะ โดยแบบกะป้อนได้ปริมาณเซลล์ 15.54g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.55g/L/d ปริมาณลิปิด 6.9g/L (44.38%DCW) อัตราการผลิตลิปิด 0.69g/L/d ในขณะที่การหมักแบบกะได้ปริมาณเซลล์ 9.51g/L อัตราการผลิตเซลล์ 0.95g/L/d ปริมาณลิปิด 4.06g/L (42.73%DCW) อัตราการผลิตลิปิด 0.41g/L/d การหมักแบบกะใช้ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 80g/L ปริมาณกลูโคสที่ใช้เพื่อการเจริญและผลิตลิปิด 67.14g/L ส่วนการหมักแบบกะป้อนใช้กลูโคสเริ่มต้น 30g/L และมีการเติมกลูโคสเป็นระยะเมื่อคำนวณกลูโคสที่ใช้ทั้งหมดเท่ากับ 52.18g/L โดยพบว่าการหมักแบบกะป้อนในการศึกษานี้ให้ปริมาณลิปิดและอัตราการผลิตลิปิดสูงกว่าอีกทั้งใช้กลูโคสต่ำกว่าการหมักแบบกะ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* Y4 ในการหมักแบบกะป้อนเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเซลล์สะสมลิปิดสูงถึง 67.5%DCW และให้ผลผลิตลิปิด (lipid productivity) 0.54 กรัมลิปิด/ลิตร/ชั่วโมง (Li et al., 2007)

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus curvatus* ด้วยการหมักแบบกะป้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและจำกัดปริมาณไนโตรเจนพบว่ายีสต์มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงถึง 53% ในเวลา 172 ชั่วโมง ที่ค่า C/N ratio เท่ากับ 75 และน้ำมันที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดโอเลอิก กรดปาล์มติกและกรดสเตียริก (Hassan et al, 1996)

ยีสต์ *C. curvatus* เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหมักแบบกะป้อน ระยะเวลาการหมัก 50 ชั่วโมง พบว่าให้ปริมาณเซลล์ 118g/L ปริมาณลิปิด 25%DCW อัตราการผลิตลิปิด 0.59 กรัมลิปิด/ลิตร/ชั่วโมง (Meesters et al., 1996) ยีสต์ *Rhodotorula glutinis* IIP-30 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหมักแบบกะป้อนภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจนให้ผลผลิตลิปิดสูงสุด 66%DCW เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และ pH 4.0 (Johnson et al., 1992) ยีสต์ *Candida viswanathii* OYS3 เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 90g/L ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน อุณหภูมิ 30°C ให้ปริมาณลิปิดที่ 4.10 g/L (52.7%DCW) และเมื่อเลี้ยงแบบกะป้อนให้ปริมาณเซลล์ 9.11 g/L ปริมาณลิปิด 59.5%DCW (Leesing and Nontaso, 2011)

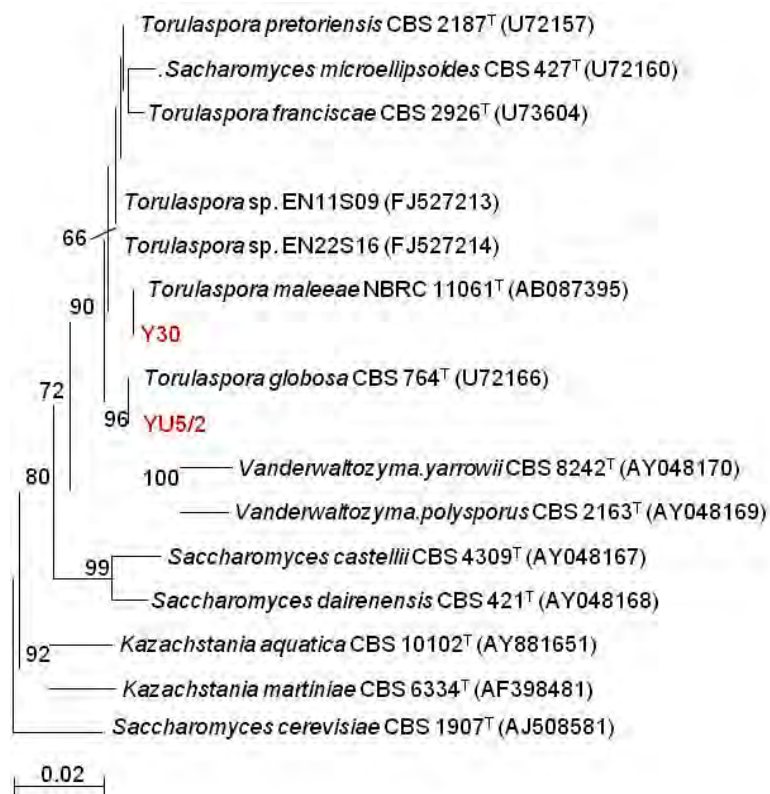
นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus* sp. SM5S05 ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนพบว่าเมื่อใช้กลูโคส 4% (w/w) ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 9.4g/L ปริมาณลิปิด 6.0g/L หรือ 63.5% (w/w) แต่มีผลการยับยั้งการเจริญและการผลิตลิปิด (inhibitory effect) เมื่อกลูโคสเข้มข้น 6% ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนสามารถลดผลของ inhibitory effect ลงได้ โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร corn cob hydrolysate ที่มีน้ำตาลรีดิคัลเริ่มต้น 4% และเติมกลูโคส 2% ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงได้ปริมาณเซลล์ 10.8 g/L และปริมาณลิปิด 61.3% (w/w) ผลผลิตรวมของลิปิด (overall lipid production) เพิ่มขึ้นเป็น 1.08g/L/d (Chang et al., 2013)

Zhang et al. (2011) รายงานการผลิตลิปิดจากยีสต์ *Cryptococcus curvatus* O3 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนในระดับฟลาสก์เขย่าที่ 30C ได้ปริมาณเซลล์ 51.8kg/m³ และปริมาณลิปิด 651g/kg ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบกะป้อนในถังหมัก Stirred-tank fermentor ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 185 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์ 104.1kg/m³ ปริมาณลิปิด 827g/kg และอัตราการผลิตลิปิด 0.47kg/m³/h

อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าผลการศึกษาในยีสต์ YU5/2 ได้ปริมาณลิปิดแตกต่างกันไม่มากนัก ซึ่งอาจเนื่องมาจากการหมักแบบกะป้อนในการศึกษานี้รูปแบบการเติมสารอาหารอาจยังไม่เหมาะสมต่อการผลิตและสะสมลิปิด

4.4 การบ่งเอกลักษณ์ของยีสต์พื้นถิ่นลิปดสูงที่คัดเลือกได้

การบ่งเอกลักษณ์ยีสต์ไอโซเลท YU5/2 โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26SrDNA เมื่อนำ PCR product มาหาลำดับเบสโดยวิธี direct sequencing และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLAST analysis ของยีน 26SrRNA ของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 และสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี neighbor-joining เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ายีสต์ไอโซเลท YU5/2 มีลำดับเบสของยีสต์ *Torulaspora globosa* CBS 764 (รูปที่ 4.38) และผลของลำดับเบส 26SrDNA ของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 มีความสอดคล้องกันกับ *Torulaspora globosa* (รูปที่ 4.39) ดังนั้นยีสต์ไอโซเลท YU5/2 จึงจัดเป็นยีสต์ *Torulaspora globosa* และให้ชื่อว่า *Torulaspora globosa* YU5/2



รูปที่ 4.38 Phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene, showing position of the isolate YU5/2 with closely related species. The phylogenetic tree was constructed from the evolutionary distance data corrected by two-parameter transformation of Kimura (1980), using the neighbor-joining method. Numbers indicate percentages of bootstrap sampling, derived from 1000 samples.

Query	1	AAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT	60
Sbjct	1	AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT	60
Query	61	CTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGTAACTTGGGGCTGGTCCTTGT	120
Sbjct	61	CTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGTAACTTGGGGCTGGTCCTTGT	120
Query	121	CTATGTTCTTGGAAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAG	180
Sbjct	121	CTATGTTCTTGGAAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAG	180
Query	181	TTCTATGTAAAGTGCTTTTGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG	240
Sbjct	181	TCCTATGTAAAGTGCTTTTGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG	240
Query	241	TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG	300
Sbjct	241	TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG	300
Query	301	AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG	360
Sbjct	301	AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG	360
Query	361	GGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCTCTGCTCCTCGTGGGTGGGGGAATCTCGC	420
Sbjct	361	GGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTGGGGGAATCTCGC	420
Query	421	AGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGTAGGATAAATCTGCAGGAATGTAGCTTGCT	480
Sbjct	421	AGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGTAGGATAAATCTGCAGGAATGTAGCTTGCT	480
Query	481	TCGGCAAGTGTTATAGCCTGTTGAAATACTGCCAGCCGGGACTGAGGACTGCGACTTTTA	540
Sbjct	481	TCGGCAAGTGTTATAGCCTGTTGAAATACTGCCAGCCGGGACTGAGGACTGCGACTTTTA	540
Query	541	GTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGC	573
Sbjct	541	GTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGC	573

รูปที่ 4.39 Sequence alignment of the yeast isolate YU5/2 against D1/D2 of 26S rDNA sequence data of *Torulaspora globosa* showing no base substitutions.

4.5 การศึกษาองค์ประกอบของลิพิดที่ผลิตโดย *Torulaspora globosa* YU5/2

การศึกษานิตและปริมาณของกรดไขมันที่พบในยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2 ในรูป Fatty acid methyl esters (FAMES) พบว่าองค์ประกอบหลักประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นกรดไขมันชนิดกรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0) กรดสเตียริก (stearic acid, C18:0) กรดปาล์มิตอเลอิก (palmitoleic acid, C17:1) และกรดโอเลอิก (oleic acid, C18:1) ซึ่งองค์ประกอบเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช โดยกรดไขมันที่พบในเชื้อยีสต์ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) และกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) ประมาณ 54.13% และ 45.87% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดที่พบ (ตารางที่ 4.15) นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ผลิตโดยยีสต์ ยังพบกรดเพนตะเดคาโนอิก (Pentadecanoic acid, C15:0) กรดอาราซิดิก (Arachidic acid, C20:0) กรดบีฮีนิก (Behenic acid, C22:0) และกรดลิกโนเซอริก (Lignoceric acid, C24:0)

การศึกษานิตและปริมาณของกรดไขมันที่พบในยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2 ในรูป Fatty acid methyl esters (FAMES) พบว่าองค์ประกอบหลักประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นกรดไขมันชนิดกรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0) กรดสเตียริก (stearic acid, C18:0) กรดปาล์มิตอเลอิก (palmitoleic acid, C17:1) และกรดโอเลอิก (oleic acid, C18:1) ซึ่งองค์ประกอบเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช โดยกรดไขมันที่พบในเชื้อยีสต์ ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) และกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) ประมาณ 54.13% และ 45.87% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดที่พบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Li et al (2010) ที่รายงานว่ากรดไขมันส่วนใหญ่ที่ผลิตจากยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a ประกอบไปด้วย กรดปาล์มิติก (C16:0), กรดปาล์มิตอเลอิก (C16:1), กรดสเตียริก (C18:0), กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดลิกโนเลอิก (C18:2) ซึ่งมีความคล้ายกับกรดไขมันที่พบในน้ำมันที่สกัดจากพืช Leesing and Karraphan (2011) พบว่ากรดไขมันที่พบในยีสต์ *Torulaspora maleeae* Y30 ที่คัดแยกจากดินประกอบด้วยกรดไขมันหลักคือ กรดปาล์มิติก กรดสเตียริกและกรดโอเลอิก

ตารางที่ 4.15 ปริมาณกรดไขมันที่พบในผลิตภัณฑ์สกัดได้จากยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2

Fatty acid type	Fatty acid profile <i>FAMES</i>	Fatty acid (%,w/w TFA*)
Saturated fatty acid (45.87%)	Capric acid (C10:0)	
	<i>Capric Acid Methyl Ester</i>	3.84
	Lauric acid (C12:0)	
	<i>Lauric Acid Methyl Ester</i>	1.53
	Myristic acid (C14:0)	
	<i>Myristic Acid Methyl Ester</i>	2.30
	Palmitic acid (C16:0)	
	<i>Palmitic Acid Methyl Ester</i>	27.64
	Heptadecanoic acid (C17:0)	
	<i>Heptadecanoic Acid Methyl Ester</i>	4.05
	Stearic acid (C18:0)	
	<i>Stearic Acid Methyl Ester</i>	12.37
Unsaturated fatty acid (54.13%)	Palmitoleic acid (C16:1)	
	<i>Palmitoleic Acid Methyl Ester</i>	17.87
	Oleic acid (C18:1)	
	<i>cis-9-Oleic Acid Methyl Ester</i>	20.59
	Linoleic acid (C18:2)	
	<i>cis-9,12-Linoleic Acid Methyl Ester</i>	2.02
	Eicosadienoic acid (C20:2)	
	<i>cis-11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester</i>	1.10
	Eicosatrienoic acid (C20:3)	
	<i>cis-8,11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester</i>	3.48

ยีสต์ *C. curvatus* เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน กรดไขมันหลักที่พบประกอบด้วยกรดลิโนเลอิก (C18:2) กรดสเตียริก (C18:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) (Meesters et al., 1996) ลิพิดที่ผลิตโดยยีสต์ *Trichosporon fermentans* ประกอบไปด้วย

กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก กรดโอเลอิกและกรดลิโนเลอิก เป็นองค์ประกอบหลักและยังพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวประมาณร้อยละ 64 ของกรดไขมันที่พบ (Zhu et al., 2008)

ยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* Y4 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าน้ำมันที่สกัดได้ประกอบด้วยกรดไขมันหลักๆ คือ กรดปาล์มิติก กรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดลิโนเลอิก ซึ่งใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ (Li et al., 2007) นอกจากนี้ Li et al. (2007) พบว่ากรดไขมันจะเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *Cryptococcus albidus* คือ ในช่วงที่เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วปริมาณของกรดลิโนเลอิกและกรดลิโนเลนิกจะมีปริมาณสูงและลดลงตามปริมาณการเพิ่มขึ้นของกรดโอเลอิก กรดปาล์มิติกและกรดสเตียริก

Xu et al (2012) เพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะขั้นตอนเดียว (one-stage batch cultivation) ชนิดและปริมาณกรดไขมันหลักที่พบคือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0), C18:0 (stearic acid), C18:1 (oleic acid) และ C18:2 (linoleic acid) ที่ 26%, 12%, 45% และ 11% ของกรดไขมันทั้งหมด (total fatty acid) ตามลำดับ Wang et al., (2012) รายงานว่ามากกว่า 96.8% ของกรดไขมันที่พบในยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* 21167 คือ C16:0, C18:0, C18:1 และ C18:2 โดยเฉพาะ C18:1 (53.34%) ซึ่งทำให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีคุณภาพสูง Zhang et al. (2011) รายงานการผลิตลิปิดจากยีสต์ *Cryptococcus curvatus* O3 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน องค์ประกอบหลักของลิปิดพบว่าเป็นกรดไขมันชนิดสายยาว (long-chain fatty acids) ประกอบด้วยกรดปาล์มิติก (palmitic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) กรดโอเลอิก (oleic acid) และลิโนเลอิก (linoleic acid)

4.6 การผลิตไบโอดีเซลระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยการนำเซลล์ยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและนำไปทำแห้งแบบแช่แข็งด้วยเครื่อง freeze dryer (รูปที่ 4.40) จากนั้นศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในรูป fatty acid methyl esters (FAMES) แบบโดยตรงจากเซลล์ยีสต์แห้ง (direct transesterification) ตามวิธีการที่ดัดแปลงของ Bradley and Robert (2011) เมื่อวิเคราะห์คุณภาพโดยหาปริมาณค่าของกรด (acid value) โดยไทเทรตสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลาย 0.1 N KOH พบว่ามีปริมาณค่าของกรดเท่ากับ 3.929 mgKOH/g ของ FAME และมีปริมาณไบโอดีเซลเท่ากับ 69.1% ของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

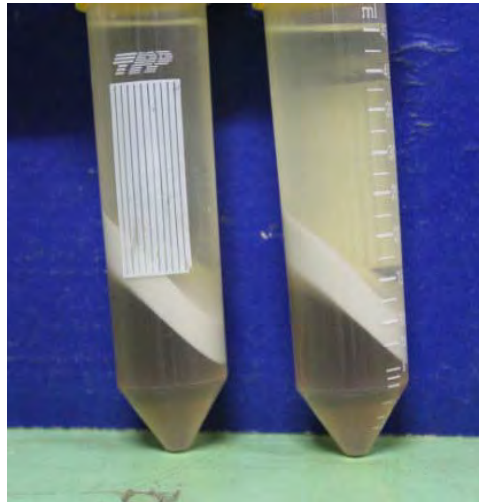
การผลิตไบโอดีเซลในรูป fatty acid methyl esters (FAMES) แบบโดยตรงจากเซลล์ยีสต์แห้ง (direct transesterification) ตามวิธีการที่ดัดแปลงของ Bradley and Robert (2011) เมื่อวิเคราะห์คุณภาพโดยหาปริมาณค่าของกรด (acid value) โดยไทเทรตสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลาย 0.1 N KOH พบว่ามีปริมาณค่าของกรดเท่ากับ 3.929 mgKOH/g ของ FAME และมีปริมาณไบโอดีเซลเท่ากับ 69.1% ของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งจะเห็นว่าค่าของกรด (Acid value) สูงกว่าค่าตามมาตรฐานไบโอดีเซล (ASTM D664) เมื่อเปรียบเทียบกับไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชและมาตรฐานไบโอดีเซลตามประกาศของกรมธุรกิจพลังงาน พ.ศ. 2550 นั้นค่าของกรด (acid value) ต้องต่ำกว่า 0.5mgKOH/g (ASTM D664) โดยค่าของกรดนี้จะอ้างอิงถึงปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid, FFA) ที่พบในน้ำมันหรือลืปิดที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นในการศึกษาต่อไปอาจทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) เพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิสระลงโดยถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอไรด์จากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซลต่อไป



รูปที่ 4.40 แสดงเซลล์แห้งของยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง

รูปที่ 4.41 แสดงการแยกชั้นของสารละลาย โดยชั้นบนเป็นส่วนของน้ำและแอลกอฮอล์ ตรงกลางเป็นส่วนของกากเซลล์ และส่วนล่างเป็นชั้นของ fatty acid methyl esters (FAMES) และ

ไตรกลีเซอรอล (triacylglycerol, TAG) บางส่วนที่เหลือและคลอโรฟอร์ม นำสารละลายส่วนล่างมาแยกตัวทำละลาย คลอโรฟอร์มออกด้วยวิธีการระเหย (Evaporation) เพื่อให้เหลือเพียงส่วนของไบโอดีเซลในรูปของ FAMES, และ TAG (รูปที่ 4.42)



รูปที่ 4.41 การแยกชั้นของสารละลายในขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล



รูปที่ 4.42 แสดงน้ำมันยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2 ในรูปของ FAME ที่ผลิตได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 การคัดเลือกเชื้อยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง

การคัดแยกยีสต์ไขมันสูง (oleaginous yeast) หรือยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตและสะสมลิพิดภายในเซลล์จากตัวอย่างดินจำนวน 101 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ อุดรธานี และนครราชสีมา ได้ยีสต์จำนวน 155 ไอโซเลทและเมื่อคัดเลือกเบื้องต้น (primary screening) เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีการสะสมลิพิดภายในเซลล์สูงโดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรไนโตรเจนต่ำ บ่มที่ 30°C ที่ความเร็วรอบ 130 rpm เป็นเวลา 6 วัน พบยีสต์จำนวน 37 ไอโซเลทที่เป็นยีสต์ไขมันสูงเนื่องจากสะสมลิพิดภายในเซลล์ได้สูงกว่า 20% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) และจำนวน 3 ไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงในการผลิตลิพิดคือ ยีสต์ไอโซเลท YK36.4, YU12.1 และ YU5/2

5.2 การศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตลิพิดของยีสต์ไขมันสูง

5.2.1 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการผลิตลิพิด

เมื่อศึกษาระยะเวลาการเจริญและการผลิตลิพิดของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ YK36.4, YU5/2 และ YU12.1 ในอาหาร Lipid accumulation medium บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 10 วัน พบว่ายีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ในวันที่ 2 และช่วงท้ายการเจริญ (late log phase) หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase ในวันที่ 8 โดยการผลิตและสะสมลิพิดของเซลล์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญ ไอโซเลท YU12.1, YK36.4, YU5/2 ให้ปริมาณเซลล์ 9.86g/L, 9.80g/L, 9.40g/L ตามลำดับ และอัตราการผลิตเซลล์ (Q_x) ที่ 1.23g/L/d, 1.23g/L/d, 1.18g/L/d ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิพิดพบว่าไอโซเลท YU5/2 ให้ปริมาณลิพิดสูงสุดคือ 4.16g/L หรือ 44.24%DCW อัตราการผลิตลิพิด (lipid production rate) 0.52g/L/d ส่วนไอโซเลท YK36.4 ให้ปริมาณลิพิด 4.04g/L (41.20%DCW) อัตราการผลิตลิพิด 0.51g/L/d และไอโซเลท YU12.1 ให้

ปริมาณลืปิด 3.63g/L (36.79%DCW) อัตราการผลิตลืปิด 0.45g/L/d ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงคัดเลือกไอโซเลท YU5/2 ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วันเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

5.2.2 ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อศึกษาผลของ pH เริ่มต้นที่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตลืปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 บ่มเขย่าที่ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วันพบว่าที่ pH 5.0, 6.0 ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่ pH 5.0 ได้ปริมาณเซลล์ 9.60g/L ปริมาณลืปิด 4.36 g/L หรือ 45.56%DCW อัตราการผลิตลืปิด 0.55g/L/d ส่วนที่ pH 6.0 ได้ปริมาณเซลล์ 10.19g/L ปริมาณลืปิด 4.55g/L หรือ 44.68%DCW และอัตราการผลิตลืปิด 0.57g/L/d

5.2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์

การศึกษาผลของอุณหภูมิ (25, 30, 35°C) ต่อการเจริญและการผลิตลืปิดของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 30°C ให้ปริมาณเซลล์ 8.65g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.08g/L/d ปริมาณลืปิดสูงสุดที่ 3.70 g/L (42.84%DCW) และอัตราการผลิตลืปิด 0.46g/L/d

5.2.4 ผลของปริมาณความเข้มข้นของอนินทรีย์ไนโตรเจน

การศึกษาปริมาณของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนคือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 g/L) พบว่า $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 0.1 g/L ยีสต์มีการเจริญต่ำสุดโดยให้ปริมาณเซลล์ 7.91 g/L อัตราการผลิตเซลล์ 0.99g/L/d แต่เซลล์สะสมลืปิดสูงสุด 3.46 g/L (43.77%DCW) และอัตราการผลิตลืปิด 0.43g/L/d

5.2.5 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ยูเรีย, NaNO_3) ต่อการเจริญและการผลิตลืปิดของยีสต์ YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L พบว่าได้ปริมาณเซลล์ 6.58, 6.95g/L และอัตราการผลิตเซลล์ 0.82, 0.87g/L/d และให้ปริมาณลืปิด 3.34g/L (41.72%DCW), 3.35g/L (41.26%DCW) เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ และอัตราการผลิตเท่ากันที่ 0.42g/L/d ในอาหารที่มี NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ปริมาณเซลล์ 7.13g/L อัตราการผลิตเซลล์ 0.89g/L/d ปริมาณลืปิด 3.20g/L (38.16%DCW) และอัตราการผลิตปริมาณ 0.40g/L/d

5.2.6 ผลของปริมาณกลูโคส

เมื่อศึกษาผลของปริมาณกลูโคส (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100g/L) โดยคงที่ปริมาณของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lipid accumulation medium ที่มีกลูโคส 80g/L เซลล์สะสมลิปิดสูงสุดที่ 4.16g/L (45.73%DCW) อัตราการผลิตลิปิด 0.52g/L/d เมื่อกลูโคส 60g/L ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 9.05g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.13g/L/d ปริมาณลิปิด 3.02g/L (33.36%DCW) อัตราการผลิตลิปิด 0.38g/L/d ส่วนกลูโคสที่ 20g/L ให้ปริมาณลิปิดต่ำสุดที่ 2.36g/L และอัตราการผลิตลิปิด 0.30g/L/d

5.2.7 ผลของชนิดและปริมาณของไอออนบวก

เมื่อศึกษาผลของปริมาณไอออนบวก (cat-ions) ต่อการผลิตลิปิดของยีสต์ YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lipid accumulation medium ที่มีกลูโคส 80 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm, 30°C, 8 วัน แปรผัน Ca^{2+} (15–40mg/L) ปริมาณ Mn^{2+} (0.03–0.07mg/L) ปริมาณ ZnSO_4 (Zn^{2+} , 2.0–7.0mg/L) ปริมาณ Mg^{2+} (0.5–2.5mg/L) ปริมาณ Cu^{2+} (0.1–0.5mg/L) ปริมาณ Fe^{2+} (12–20mg/L) พบว่าในอาหารที่มี Ca^{2+} 25 mg/L, Mn^{2+} 0.05 mg/L, Zn^{2+} 4.0 mg/L, Mg^{2+} 1.5 g/L, Cu^{2+} 0.3 mg/L, Fe^{2+} 18 mg/L เซลล์ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.50 g/L หรือ 44.48%DCW อัตราการผลิตลิปิด 0.44g/L/d

5.3 ศึกษาการผลิตลิปิดด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกะป้อน

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ด้วยการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80 g/L ที่มี pH เริ่มต้น 5.0 ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/L, Ca^{2+} 25 mg/L, Mn^{2+} 0.05 mg/L, Zn^{2+} 4.0 mg/L, Mg^{2+} 1.5 g/L, Cu^{2+} 0.3 mg/L, Fe^{2+} 18 mg/L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตรทำงาน 1.5 ลิตร บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 10 วัน ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะป้อน (fed-batch fermentation) สภาวะเช่นเดียวกับแบบกะ แต่มีกลูโคสเริ่มต้น 30 g/L และควบคุมระบบโดยการเติมน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 100% (1.0g/mL) จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณเซลล์ที่ได้จากการหมักแบบกะป้อนสูงกว่าการหมักแบบกะ โดยแบบกะป้อนได้ปริมาณเซลล์ 15.54g/L อัตราการผลิตเซลล์ 1.55g/L/d ปริมาณลิปิด 6.9g/L (44.38%DCW) อัตราการผลิตลิปิด 0.69g/L/d ในขณะที่การหมักแบบกะได้ปริมาณเซลล์ 9.51g/L อัตราการผลิตเซลล์ 0.95g/L/d ปริมาณลิปิด 4.06g/L (42.73%DCW) อัตราการผลิตลิปิด 0.41g/L/d การหมัก

แบบกะใช้ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 80g/L ปริมาณกลูโคสที่ใช้เพื่อการเจริญและผลิตลิปิด 67.14g/L ส่วนการหมักแบบกะป้อนใช้กลูโคสเริ่มต้น 30g/L และมีการเติมกลูโคสเป็นระยะเมื่อคำนวณกลูโคสที่ใช้ทั้งหมดเท่ากับ 52.18g/L

5.4 การบ่งเอกลักษณ์ของยีสต์พื้นถิ่นลิปิดสูงที่คัดเลือกได้

เมื่อบ่งเอกลักษณ์ยีสต์ไอโซเลท YU5/2 โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26SrDNA เมื่อนำ PCR product มาหาลำดับเบสโดยวิธี direct sequencing และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLAST analysis ของยีน 26SrRNA ของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 และสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี neighbor-joining เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ายีสต์ไอโซเลท YU5/2 มีลำดับเบสของยีสต์ *Torulaspora globosa* CBS 764 และผลของลำดับเบส 26SrDNA ของยีสต์ไอโซเลท YU5/2 มีความสอดคล้องกันกับ *Torulaspora globosa* ดังนั้นยีสต์ไอโซเลท YU5/2 จึงจัดเป็นยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2

5.5 การศึกษาองค์ประกอบของลิปิดที่ผลิตโดย *Torulaspora globosa* YU5/2

การศึกษานิวคลีโอไทด์และปริมาณของกรดไขมันที่พบในยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2 ในรูป Fatty acid methyl esters (FAMES) พบว่าองค์ประกอบหลักประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นกรดไขมันชนิดกรดปาล์มิติก (palmitic acid, C16:0) กรดสเตียริก (stearic acid, C18:0) กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid, C17:1) และกรดโอเลอิก (oleic acid, C18:1) ซึ่งองค์ประกอบเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช โดยกรดไขมันที่พบในเชื้อยีสต์ ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) และกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) ประมาณ 54.13% และ 45.87% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดที่พบ

5.6 การผลิตไบโอดีเซลระดับห้องปฏิบัติการ

การผลิตไบโอดีเซลในรูป Fatty acid methyl esters (FAMES) แบบโดยตรงจากเซลล์ยีสต์แห้ง (direct transesterification) ตามวิธีการที่ดัดแปลงของ Bradley and Robert (2011) เมื่อวิเคราะห์คุณภาพโดยหาปริมาณค่าของกรด (acid value) โดยไตเตรทสารละลายตัวอย่างด้วย

สารละลาย 0.1 N KOH พบว่ามีปริมาณค่าของกรดเท่ากับ 3.929 mgKOH/g ของ FAME และมีปริมาณไบโอดีเซลเท่ากับ 69.1% ของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

5.7 ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยในอนาคต

จากการศึกษาพบว่าปริมาณเซลล์และลิปิดยังไม่สูงมากนักอาจเนื่องมาจากกระบวนการผลิตยังไม่เหมาะสม ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญและผลิตลิปิดคือแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน การลดต้นทุนการผลิตที่สามารถทำได้อีกประการหนึ่งคือการหาแหล่งไนโตรเจนราคาถูก เช่น การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ (organic fertilizer) หรือน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) เป็นต้น นอกจากนั้นควรหาแหล่งคาร์บอนอื่นๆ แทนการใช้กลูโคส เช่น ของเสียหรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น กากน้ำตาล (molasses) หรือน้ำกากส่า (distillery slop) หรือของเหลือทิ้งจากการผลิตไบโอดีเซล เช่น กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) เป็นต้น นอกจากนี้การปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมก็อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณการผลิตลิปิดได้ การผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยตรงจากเซลล์สาหร่ายเป็นวิธีหนึ่งที่จะลดต้นทุนในการผลิตลงโดยการลดสารเคมีและตัวทำละลายในการสกัดลิปิดหรือน้ำมันออกจากเซลล์ดังนั้นจึงต้องศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีการดังกล่าว เช่น การหาชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสม การใช้ไมโครเวฟหรืออัลตราโซนิกช่วยในการทำปฏิกิริยาเป็นต้น นอกจากนั้นควรศึกษาการลดปริมาณคลอโรฟิลล์ในเซลล์ลงเพื่อให้ได้น้ำมันที่ใสมากขึ้น

ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Torulaspora globosa* YU5/2 เพื่อผลิตลิปิดหรือน้ำมันควรศึกษาหาทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น การใช้กากน้ำตาล (molasses) หรือน้ำกากส่า (distillery slop) ที่เป็นน้ำเสียจากการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล การใช้กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ของเสียจากการผลิตไบโอดีเซล เป็นต้น หรือการใช้ผลผลิตทางการเกษตรอื่นๆ เช่น มันเทศ (sweet potato) หัวแก่ตะวันหรือเศษเหลือจากหัวแก่ตะวัน (Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus* L.) หรือพืชอื่นๆ ที่ไม่ใช่พืชอาหารหลักเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นต้น ส่วนแหล่งไนโตรเจนราคาถูกที่สามารถนำมาใช้ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) หรือปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ (biofertilizer) เป็นต้น

นอกจากนั้นควรศึกษาการผลิตลิปิดหรือไขมันร่วมกันโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงร่วมกับสาหร่ายขนาดทั้งระบบการเพาะเลี้ยงแบบเชื้อผสม (Mixed-culture system) กับสาหร่ายที่

สามารถเจริญแบบเฮเทโรโทรฟิกได้ เช่น *Chlorella* sp. KKU-S2 และหรือระบบการเพาะเลี้ยงแบบบูรณาการ (integrated culture system) ระหว่างยีสต์กับสาหร่ายขนาดเล็ก โดยการนำคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ต่อเข้ากับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กทั้งแบบการเพาะเลี้ยงภายใต้การสังเคราะห์แสง (photoautotrophic cultivation) โดยสาหร่ายใช้ CO₂ เป็นแหล่งคาร์บอน และการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะмикโซโทรฟิก (mixotrophic cultivation) ที่สาหร่ายสามารถใช้ทั้ง CO₂ และสารอินทรีย์ เช่น กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งระบบการผลิตลิปิดผ่านทั้ง mixed-culture system และ integrated culture system อาจทำให้ผลผลิตลิปิดสูงขึ้นนอกจากนั้นยังเป็นการใช้ CO₂ ให้เกิดประโยชน์สูงสุดซึ่งเป็นการลดการปล่อย CO₂ ออกสู่บรรยากาศได้อีกทางหนึ่งด้วย

บรรณานุกรม

1. ด้วง พุศุกรณ์. (2534). ไขมันและเคมีภัณฑ์จากไขมัน โครงการตำราและเอกสารประกอบการเรียน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. หน้า 23-28.
2. ประหยัด โกมารทัต. (2537). ลิปิด: โครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติทั่วไป การประชุมปฏิบัติการภาคฤดูร้อน สาขาชีวเคมี ครั้งที่ 19 เรื่อง ลิปิด ชีวเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ วันที่ 4 พฤษภาคม กรุงเทพมหานคร. หน้า 6-16.
3. Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G.M. (2008). Conversion of sewage sludge into lipid by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour Technol.* 99, 3051-3056.
4. Antolin, G., Tinaut, F.V., Briceno, Y., Castano, V., Perez, C., Ramirez, A.I. (2002). Optimization of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresour. Technol.* 83: 111-114.
5. Bradley, D. W., Robert, M. W., Lance, C. S. (2011). Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology* 102(3): 2724-2730.
6. Chang, Y-H, Chang, Y, Hsu, C-L, Chuang, L-T, Chen, C-Y, Huang, F-Y, Jang, H-D. (2013). A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production *Fuel* 105 : 711-717.
7. Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92:405-416.
8. Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., Compagno, C. (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology* 111 (2012) 398-403.
9. Gill, C.O., Hall, M., Ratledge, C. (1997). Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-state continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 231-239.

10. Hassan, M., Blanc, P.J., Grangerf, M.L., Pareilleux, A., Goma, G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochem.* 31: 355–361.
11. Haas, M.J. (2005). Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. *Fuel Process Technol* 86:1087–1096.
12. Huang, G–H., Chen, F., Wei, D., Wu, X., Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl Energy* 87: 38–46.
13. Huang C, Zong MH, Wu H, Liu QP (2009). Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology* 100 (19):4535–4538.
14. Johnson, V., Singh, M., Saini, V.S., Sista, V.R., Yadav, N.K. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP–30. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 382–384.
15. Kwon, D.Y., Rhee, J.S. (1986). A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. *J Am. Oil Chem. Soc.* 63:89–92.
16. Kurtzman CP, Robnett CJ (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 331–371.
17. Lang, X., Dalai, A.K., Bakhshi, N.N., Reaney, M.J., Hertz, P.B., (2001). Preparation and characterization of bio–diesel from various bio–oils. *Bioresour. Technol.* 80:53–62.
18. Leasing, R., Nontaso, N. (2011). Isolation and cultivation of oleaginous yeast for microbial lipid production. *KKU Research Journal*, 16 (2): 8–22.
19. Leasing, R., Karaphan, P. (2011). Kinetic growth of the isolated oleaginous yeast for lipid production. *African Journal of Biotechnology*, 10 (63): 13867–13877.
20. Li, Y.–H., L., Bo, L., Zong–Bao, Z., Feng–Wu, B. (2006). Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese J. Biotechnol.*, 22: 650–656.

21. Li, Y., Zhao, Z., Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microbiol. Technol.* 41: 312–317.
22. Li, M., Liu, G.L., Chi, Z., Chi, Z.M. (2010). Single cell oil production from hydrolysate of cassavastarch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass Bioener* 34:101–107.
23. Lin, L., Cunshan, Z., Vittayapadung, S., Xiangqian, S., Mingdong, D. (2010). Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Appl Energy*, doi:10.1016/j.apenergy.2010.09.029
24. Lim, S., Teong, L.K. (2010). Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: an overview. *Renew Sust Energy Rev* 14:938–54.
25. Meesters, P.A.E.P., Huijberts, G.N.M., Eggink, G. (1996). High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 575–579.
26. Moon, N.J., Hammond, E.D., Glatz, B.A. (1978). Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single-cell protein. *J. Dairy Sci.* 61:1537–1547.
27. Munglia, L., Kiss, L.N., Fonteix, C., Marc, I. (2005). Multicriteria optimization of a single-cell-oil production. *European J. Operational Research* 153: 360–369.
28. Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. (2004). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Biores Technol.* 95: 287–291.
29. Ratledge, C. (1981). Yeast and mould as sources of oils and fats: New sources of fat and oils. In eds. Mukherjee, K.D. *American Oil Chemists' Society Champaigne, IL*. Pp. 159–169.
30. Ratledge, C. (1991). Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnol.* 11:429–438.
31. Ratledge, C., James, P.W. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 51: 1–51.
32. Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807–815.
33. Ratledge C, Evans CT. (1989). Lipids and their metabolism. In: Rose AH, Harrison JS, editors. *The Yeasts*. Ed 2. Vol. 3. London: Academic Press, pp. 368–446.

34. Ratledge C, Tan, K.H. (1990). Oils and fats: production. Degradation and utilization by yeasts. In: Verachtert H, De Mot R (eds) Yeast Biotechnology and Biocatalysis. New York: Marcel Dekker, pp 223–254.
35. Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1771: 255–270.
36. Thiru, M., Sankh, S., Rangaswamy, V. (2011). Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource Technology* 102 (2011) 10436–10440.
37. Turcotte, A., Kosaric, N. (1989). The effect of C/N ratio on lipid production by *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788. *Biotechnol. Lett.* 9: 637–642.
38. Vega, E.Z., Glatz, B.A., Hammond, E.G. (1988). Optimization of banana juice fermentation for the production of microbial oil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 748–752.
39. Wang, Q., Guo, F-J., Rong, YJ, Chi, Z-M. (2012). Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making. *Renewable Energy* 46: 164–168.
40. Xue, F., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. (2006). A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochem.* 41:1699–1702.
41. Xu, J., Zhao, X., Wang, W., Du, W., Liu, D. (2012). Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochemical Engineering Journal* 65 (2012) 30– 36.
42. Zhang, J, Xu Fang, X, Zhu, X.L, Li, Y, Xu, HP, Zhao, BF, Chen, L, Zhang, XD. (2011). Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed–batch culture. *Biomass and Bioenergy* 35: 1906–1911.

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีวิเคราะห์

อาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium)

อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเตรียมเสร็จแล้วฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1. Lipid accumulation medium (g/L)

Glucose	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g
Yeast extract	0.75 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
ZnSO ₄	4.4mg
CaCl ₂	25mg
MnCl ₂	0.05 mg
CuSO ₄	0.3 mg
น้ำกลั่น	1.0 L
pH 5.0	

2. อาหารสูตรสมบูรณ์ (Enrichment medium)

Glucose	70	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH 4.0		

3. YM medium สำหรับเก็บรักษายีสต์

Glucose	10.0	g
Yeast extract	3.0	g
Malt extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L
pH 4.0		

4. อาหารสูตรไนโตรเจนต่ำ (Low-nitrogen medium)

Glucose	80	g
Yeast extract	3.0	g
Peptone	3.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L
pH 5.0		

การวัดการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้ง (dry weight method)

1. อบกระดาษกรองหรืออลูมิเนียมฟอยล์ที่พับเป็นรูปกระทง อบที่ 90°C นาน 4 ชม. นำไปทำให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด
2. ปิเปตสารแขวนลอยเชื้อ (suspension) ปริมาตร 5 mL ใส่ลงในหลอด centrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง
3. เติมน้ำกลั่น 0.5–1.0 mL ลงในเซลล์ (cell pellet) เขย่าเพื่อให้ได้สารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) และเทสารแขวนลอยเซลล์ลงในกระทงอลูมิเนียมในข้อ 1.
4. นำไปอบที่ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ทำให้เย็นในโถอบแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือ น้ำหนักแห้งของเซลล์จุลินทรีย์ต่ออาหาร 5 mL

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ DNS (Miller, 1959)

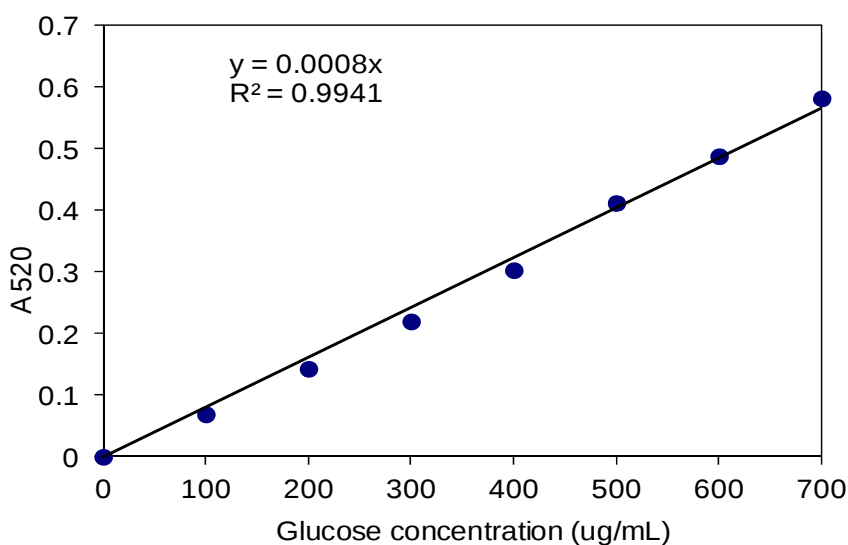
สารเคมี

1. 2 N NaOH : ปริมาตร 50 mL (4 g NaOH/ 50 mL)
2. DNS solution

เตรียมโดยละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 g ใน 50 mL ของ 2N NaOH โดยค่อยๆ เติมและคนจนละลาย จากนั้นเติม Sodium potassium tetrataurate (Rochelle salt) 7.5 g คนจนละลายเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 mL เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการทดลอง

1. ดูดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลมา 0.1–1.0 mL ใส่ลงในหลอดแก้ว ใช้น้ำกลั่นเป็น blank เติม DNS solution 1 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และปิดปากหลอดในระหว่างต้ม ทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในอ่างน้ำเย็น
2. เติมน้ำกลั่น 10 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส
3. อ่านค่าความเข้มข้นของกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก-1) ซึ่งได้จากการทดลองวิธีเดียวกันโดยใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 $\mu\text{g/mL}$



รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

การวิเคราะห์ลิปิดโดยวิธีวัดสี Colorimetric method: Know and Rhee (1986)

1) สารเคมี

- ก. สารละลาย Copper reagent ชั่ง cupric acetate 25 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 450 mL ปรับ pH 6.1 ด้วย pyridine ปรับปริมาตรเป็น 500 mL ด้วยน้ำกลั่น กรองก่อนเก็บไว้ใช้ (สารละลายคงตัวได้ 2 ปี ในที่ไม่มีแสง)
- ข. สารละลาย 1.5 M KOH ใน ethanol 80% ชั่ง KOH 84.165 g ละลายใน ethanol 80% (absolute ethanol 99.1%, 80 mL + 20 mL น้ำกลั่น) ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 mL
- ค. สารละลาย 2.5 M HCl

2) การเตรียม cell suspension ของจุลินทรีย์

โดยชั่งเซลล์น้ำหนักเปียกมา 1 g ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปรับปริมาตรเป็น 10 mL จะได้สารแขวนลอยเซลล์ 0.1 g/mL

3) การสกัดลิปิดจากเซลล์จุลินทรีย์

3.1) การสกัดลิปิดทำการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์และสกัดลิปิดออกจากเซลล์โดยซาฟอนนิฟิเคชันด้วย 1.5 M KOH ในเอทานอล 80% นำ cell suspension มา 1 mL ใส่ในหลอดจุกเกลียว ขนาด 20 mL เติม 1.5 M KOH ในเอทานอล 80% จำนวน 4 mL ปิดจุกให้แน่น ต้มเดือด 2 ชั่วโมง

3.2) เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลง เติม 2.5 M HCl จำนวน 6 mL และ isooctane 5 mL เขย่าอย่างแรง 200–300 ครั้ง/นาที เพื่อสกัดไขมันอิสระออกมาอยู่ในชั้นของ isooctane เพื่อนำไปหาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธี colorimetric method

4) การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดด้วยวิธี Colorimetric method

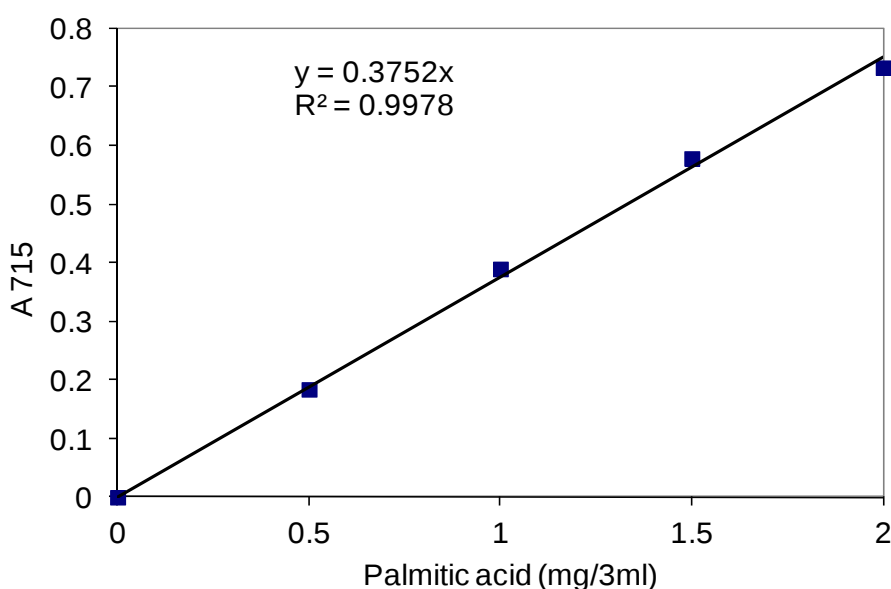
สารละลายกรดไขมันมาตรฐาน (Stock solution): 10 mg/mL โดยชั่งกรดไขมันปาล์มิติก 1.0 g ละลายใน isooctane ปรับปริมาตรเป็น 100 mL

4.1) ทำเตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ จากสารละลายกรดปาล์มิติก 10.0 mg/mL นำมาเจือจางด้วย isooctane ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง

ความเข้มข้นของสารละลายกรด ปาล์มิติก (mg/3 mL solution)	ปริมาตร stock standard (mL)	ปริมาตรของ isooctane (mL)
0.5	0.15	2.85
1.0	0.30	2.70
1.5	0.45	2.55
2.0	0.60	2.40

4.2) ปิเปตแต่ละระดับความเข้มข้นมา 3 mL เติม copper reagent 1.0 mL ปิดจุกเขย่าแรงๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 715 nm ทำกราฟมาตรฐาน (standard curve)

4.3) การหาปริมาณกรดไขมันในเซลล์จุลินทรีย์ โดยปิเปตสารละลายสกัดไขมันจากจุลินทรีย์ในข้อ 3) (การสกัดลิพิดจากเซลล์จุลินทรีย์) มา 3 mL ทำปฏิกิริยากับ copper reagent 1.0 mL ปิดจุกเขย่าแรงๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 715 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ดังรูปที่ ก-2



รูปที่ ก-2 กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติกที่ใช้วัดปริมาณลิพิดตามวิธีการของ Know and Rhee

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951)

อุปกรณ์

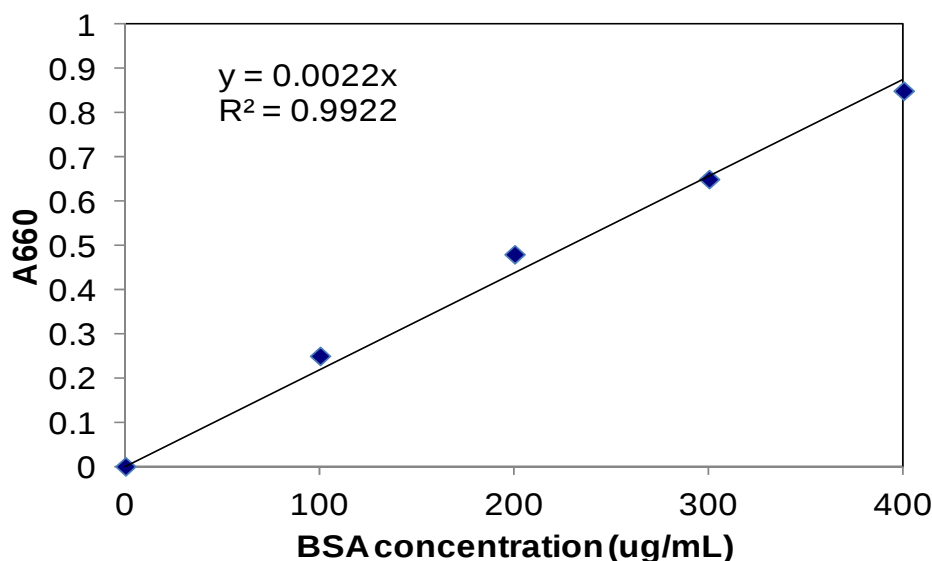
- 1) สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- 2) เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer)
- 3) หลอดทดลองพร้อมที่วาง
- 4) ปิเปตขนาด 1, 5 mL

สารเคมี

- 1) Reagent A: ละลาย Na_2CO_3 จำนวน 20 กรัม ในสารละลาย NaOH 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 1 ลิตร
- 2) Reagent B: ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 0.5 กรัม ในสารละลายไซเตียมทาร์เตรท ร้อยละ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- 3) Reagent C: ผสม 50 มิลลิลิตร ของ Reagent A กับ 1.0 มิลลิลิตรของ Reagent B (ใช้ภายใน 1 วัน)
- 4) Reagent D: Commercial Folin–Ciocalteu โดยผสมในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน Commercial Folin–Ciocalteu : น้ำกลั่นเท่ากับ 1:1

วิธีการทดลอง

- 1) ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมลงใน Reagent C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
- 2) เติม Reagent D ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเทียบกับ blank โดยใช้ น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่างอ่านค่าความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน
- 3) การสร้างกราฟมาตรฐาน ทำได้โดยการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1–5 โดยใช้ BSA (Bovine Serum Albumin) เข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แทนสารละลายตัวอย่าง
- 4) รูปที่ ก-3 เป็นกราฟมาตรฐานของ BSA สำหรับการวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการ Lowry method



รูปที่ ก-3 กราฟมาตรฐานของ BSA สำหรับการวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการ Lowry method

การวิเคราะห์หาปริมาณค่าของกรด (Acid value)

สารเคมี

1. 95% แอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ปรับสภาพให้เป็นกลาง โดยเติม 1% ฟีนอล์ฟทาลีน 5 หยด ลงในแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 200 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลาย 0.1 N KOH โดยหยดทีละหยดและเขย่า จนได้สีชมพูถาวร (เตรียมก่อนการใช้งาน)
2. 1% ฟีนอล์ฟทาลีน (ละลายในแอลกอฮอล์)
3. 0.1 N KOH

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมัน (3 ตำแหน่ง) ประมาณ 2-5 g. ใส่ในฟลasks ขนาด 250 mL ซึ่งแห้งสนิท เติมสารละลายแอลกอฮอล์ 95% ที่ปรับสภาพเป็นกลาง ลงไป 50 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงให้ตัวอย่างน้ำมันละลายในสารละลายแอลกอฮอล์ ถ้าละลายได้ไม่ดีให้อุ่นที่ 60-65°C ไตเตรทสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลาย 0.1 KOH เขย่าขณะไตเตรท ไตเตรทจนได้สีชมพูถาวร จดปริมาตร 0.1 KOH ที่ใช้
2. การคำนวณ ปริมาณกรดไขมันอิสระ จากสูตร

$$\text{ค่าของกรด FFA} = (V \times N \times 25.6) / W$$

V = ปริมาตรของ 0.1 KOH ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

N = ความเข้มข้นของ NaOH

ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบจากการทดลอง

ตารางที่ ข-1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YK36/4 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid content (%CDW)	Lipid (g/L)	Residue sugar (g/L)
0	1.20	2.75	0.03	73.14
2	6.20	15.61	0.97	10.36
4	8.10	16.30	1.32	10.21
6	9.40	27.79	2.61	13.43
8	9.80	41.20	4.04	16.64
10	9.70	30.33	2.94	25.43

ตารางที่ ข-2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid content (%CDW)	Lipid (g/L)	Residue sugar (g/L)
0	1.80	3.92	0.07	73.14
2	5.30	9.90	0.52	11.43
4	7.20	18.58	1.34	13.43
6	8.50	34.91	2.97	19.14
8	9.40	44.24	4.16	17.07
10	9.20	31.22	2.87	14.71

ตารางที่ ข-3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU12/1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid content (%CDW)	Lipid (g/L)	Residue sugar (g/L)
0	1.10	0.37	0.00	73.14
2	6.60	11.69	0.77	9.29
4	8.50	23.01	1.96	7.71
6	9.50	35.99	3.42	14.86
8	9.86	36.79	3.63	17.21
10	9.80	19.36	1.90	15.43

ตารางที่ ข-4 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU12/1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารต่างกัน ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 10 วัน

pH	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (% CDW)
3	9.60	3.213	33.523
4	9.80	3.272	33.466
5	9.60	4.364	45.563
6	10.19	4.552	44.681
7	10.18	3.747	36.801

ตารางที่ ข-5 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/g)	Lipid (g/L)	Lipid content (% CDW)
2	5.4	0.091	0.491	9.094
4	8.2	0.243	1.994	24.317
8	9.1	0.361	3.280	36.045

ตารางที่ ข-6 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/g)	Lipid (g/L)	Lipid content (% CDW)
2	4.8	0.08	0.40	8.44
4	7.5	0.25	1.91	25.47
8	8.65	0.42	3.70	42.84

ตารางที่ ข-7 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/g)	Lipid (g/L)	Lipid content (% CDW)
2	4.2	0.1309	0.5497	13.089
4	7.5	0.2714	2.0354	27.139
8	7.3	0.3655	2.78	36.41

ตารางที่ ข-8 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/g)	Lipid (g/L)	Lipid content (% CDW)
2	5.00	0.06	0.32	6.37
4	6.60	0.13	0.88	13.26
6	7.40	0.26	1.89	25.52
8	6.20	0.49	3.01	48.52

ตารางที่ ข-9 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/g)	Lipid (g/L)	Lipid content (% CDW)
2	5.60	0.02	0.10	1.75
4	6.45	0.09	0.58	8.98
6	7.10	0.21	1.50	21.14
8	7.60	0.35	2.67	35.17

ตารางที่ ข-10 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3g/L ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/g)	Lipid (g/L)	Lipid content (% CDW)
2	5.85	0.05	0.27	4.56
4	6.75	0.09	0.59	8.72
6	6.95	0.14	0.99	14.25
8	7.40	0.24	1.81	24.49

ตารางที่ ข-11 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/g)	Lipid (g/L)	Lipid content (% CDW)
2	5.10	0.04	0.18	3.53
4	5.65	0.06	0.32	5.71
6	7.80	0.17	1.35	17.25
8	7.90	0.28	2.21	27.99

ตารางที่ ข-12 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 80g/L ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g/L บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/g)	Lipid (g/L)	Lipid content (% DCW)
2	5.10	0.04	0.18	3.53
4	7.70	0.04	0.32	4.20
6	6.30	0.14	0.86	13.68
8	7.90	0.28	2.21	27.99

ตารางที่ ข-13 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 80g/ และมี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	1.42	0.02	1.10	77.143	0.588
2	3.75	0.18	4.93	55.714	1.241
4	5.75	0.72	12.51	50.01	2.621
6	7.38	1.40	19.02	31.429	3.537
8	8.00	3.34	41.72	15.714	4.895

ตารางที่ ข-14 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ยูเรีย (Urea) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	1.18	0.03	2.36	68.571	0.464
2	3.63	0.22	5.94	57.143	1.381
4	6.50	0.82	12.68	37.141	2.114
6	7.50	1.44	19.21	27.143	4.039
8	8.13	3.35	41.26	7.149	4.381

ตารางที่ ข-15 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	1.25	0.01	0.97	64.286	0.626
2	4.38	0.19	4.26	47.143	1.214
4	6.75	0.75	11.05	34.286	2.773
6	7.38	1.38	18.68	27.143	3.851
8	8.38	3.20	38.16	11.429	4.956

ตารางที่ ข-16 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 20g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	2.25	0.04	1.56	14.29	0.39
2	5.38	0.20	3.65	11.43	0.87
4	6.13	1.01	16.41	7.14	3.07
6	6.25	1.35	21.57	2.86	4.38
8	7.13	2.16	30.27	1.43	5.18

ตารางที่ ข-17 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารที่มีกลูโคส 30g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	1.75	0.028	1.577	24.286	0.582
2	4.25	0.224	5.268	15.714	1.429
4	6.375	0.795	12.475	12.857	2.006
6	7.25	1.243	17.148	8.5714	4.485
8	7.5	2.383	31.772	1.429	4.589

ตารางที่ ข-18 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 40g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	1.25	0.0673	5.3874	38.571	1.0839
2	5.63	0.3688	6.5566	21.429	2.4563
4	6.00	1.0877	18.129	11.429	2.7863
6	6.63	1.2187	18.395	8.5714	3.4785
8	8.45	2.9537	34.955	2.8571	3.9025

ตารางที่ ข-19 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 50g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	1.50	0.04	2.56	47.43	0.682
2	3.13	0.36	5.10	18.57	1.29
4	6.38	1.11	17.41	15.71	2.288
6	7.00	1.92	27.48	11.43	2.313
8	8.63	3.12	36.19	4.29	5.869

ตารางที่ ข-20 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 60g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
2	5.625	0.1682	2.991	25.714	1.121
4	6.5	1.3351	20.541	21.429	2.316
6	7.375	1.7823	24.167	17.143	3.332
8	9.0	3.1622	35.135	5.7143	5.58

ตารางที่ ข-21 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 70g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	1.625	0.065	3.978	67.143	0.538
2	4.875	0.192	3.929	22.857	1.134
4	6.25	1.161	18.568	18.571	2.576
6	8.125	1.814	22.328	20.123	3.468
8	8.188	3.155	38.532	7.143	5.960

ตารางที่ ข-22 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	2.5	0.0265	1.0586	74.286	0.529
2	4.8	0.2939	6.113	40.23	0.924
4	6.75	1.2791	18.949	25.714	3.707
6	7.375	1.7973	24.37	11.429	5.670
8	7.825	3.6517	46.667	7.1429	5.376

ตารางที่ ข-23 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 90g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปั่นแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm, 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	1.625	0.045	2.772	84.286	1.100
2	5.875	0.312	5.310	45.714	2.424
4	6.75	0.992	14.691	27.143	3.538
6	7.25	1.369	18.888	12.857	5.225
8	7.875	3.384	42.968	8.571	4.856

ตารางที่ ข-24 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณลิปิด (lipid content) ปริมาณลิปิด (g/L) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 100g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C, 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%CDW)	Residue sugar (g/L)	Protein (g/L)
0	1.5	0.105	7.027	97.143	1.638
2	3.25	0.385	11.85	45.714	2.651
4	6.125	1.319	21.548	31.429	3.459
6	7.0	1.797	25.676	18.571	4.928
8	8.91	3.656	41.039	14.286	6.243

ตารางที่ ข-25 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^+) ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)				
	Ca^+ 15mg/L	Ca^+ 20mg/L	Ca^+ 25mg/L	Ca^+ 30mg/L	Ca^+ 40mg/L
0	1.13	1.25	1.22	1.23	1.13
2	5.38	4.875	4.88	4.88	6.13
4	7.25	6.375	6.00	6.00	6.75
6	7.25	8.375	6.75	7.38	7.25
8	8.63	8.375	8.63	8.38	8.88

ตารางที่ ข-26 ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^{2+}) ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Lipid (g/L)				
	Ca^{2+}	Ca^{2+}	Ca^{2+}	Ca^{2+}	Ca^{2+}
	15mg/L	20mg/L	25mg/L	30mg/L	40mg/L
2	0.29	0.358	0.31	0.27	0.34
4	1.27	1.202	1.11	1.06	1.20
6	1.51	1.624	1.21	1.28	1.53
8	3.55	3.536	4.02	3.92	3.59

ตารางที่ ข-27 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และ ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ CaCl_2 (Ca^{2+}) ที่ค่า ต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของ Ca^{2+} (mg/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)
15	8.63	4.32	3.40	39.47
20	8.38	4.49	3.39	40.46
25	8.63	4.49	3.86	44.71
30	8.38	4.94	3.75	44.81
40	8.88	4.56	3.45	38.82

ตารางที่ ข-28 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)				
	Mn^{2+}	Mn^{2+}	Mn^{2+}	Mn^{2+}	Mn^{2+}
	0.03mg/L	0.04mg/L	0.05mg/L	0.06mg/L	0.07mg/L
0	1.25	1.23	1.38	1.28	1.13
2	4.88	5.75	7.00	6.00	4.88
4	6.75	6.75	7.63	6.75	6.50
6	7.50	7.50	7.63	8.50	8.00
8	8.63	8.63	8.13	8.50	8.88

ตารางที่ ข-29 ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Lipid (g/L)				
	Mn^{2+}	Mn^{2+}	Mn^{2+}	Mn^{2+}	Mn^{2+}
	0.03mg/L	0.04mg/L	0.05mg/L	0.06mg/L	0.07mg/L
0	0.03	0.04	0.07	0.04	0.03
2	0.34	0.37	0.33	0.22	0.26
4	1.44	1.08	1.16	0.95	0.88
6	1.64	1.44	1.95	2.03	1.96
8	3.29	3.62	3.71	3.67	3.49

ตารางที่ ข-30 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของ Mn^{2+} (mg/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)
0.03	8.63	5.29	3.15026	36.52
0.04	8.38	4.42	3.21665	38.41
0.05	8.13	5.13	3.55959	43.81
0.06	8.50	4.84	3.51738	41.38
0.07	8.88	4.92	3.34348	37.67

ตารางที่ ข-31 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Zn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)				
	Zn^{2+}	Zn^{2+}	Zn^{2+}	Zn^{2+}	Zn^{2+}
	2mg/L	3mg/L	4mg/L	5mg/L	6mg/L
0	1.13	1.38	1.24	1.25	1.15
2	4.38	5.25	4.50	4.25	4.75
4	6.13	6.01	6.50	5.38	7.63
6	7.13	6.50	7.38	7.25	8.13
8	8.00	8.00	8.50	8.38	8.25

ตารางที่ ข-32 ปริมาณลิพิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Zn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Lipid (g/L)				
	Zn^{2+}	Zn^{2+}	Zn^{2+}	Zn^{2+}	Zn^{2+}
	2mg/L	3mg/L	mg/L	5mg/L	6mg/L
0	0.02	0.03	0.03	0.03	0.05
2	0.39	0.26	0.23	0.20	0.39
4	0.96	0.93	0.79	1.34	1.23
6	1.65	1.53	1.88	1.87	1.57
8	3.29	3.55	3.83	3.73	3.56

ตารางที่ ข-33 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และ ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Zn^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของ Zn^{2+} (mg/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)
2	8.38	4.84	3.19	38.11
3	8.00	5.32	3.40	42.55
4	8.50	5.15	3.67	43.18
5	8.63	4.87	3.57	41.41
6	8.38	5.37	3.34	39.92

ตารางที่ ข-34 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mg^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)				
	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}
	0.5g/L	1.0g/L	1.5g/L	2.0g/L	2.5g/L
0	1.63	1.63	1.50	1.625	1.68
2	4.38	3.50	4.00	3.625	2.63
4	6.13	7.00	6.75	6.125	6.75
6	7.38	7.50	8.00	7.375	7.38
8	8.25	8.38	8.50	8.375	8.50

ตารางที่ ข-35 ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mg^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่ม แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Lipid (g/L)				
	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}
	0.5g/L	1.0g/L	1.5g/L	2.0g/L	2.5g/L
0	0.02	0.03	0.02	0.0222	0.05
2	0.24	0.32	0.19	0.3074	0.19
4	1.09	0.90	0.86	0.8598	0.96
6	1.58	1.48	1.23	1.4372	1.34
8	3.44	3.59	3.72	3.5236	3.32

ตารางที่ ข-36 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และ ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Mg^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่ม แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของ Mg^{2+}	Biomass	Protein	Lipid	Lipid content
(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(%DCW)
0.5	8.50	4.48	3.29	38.69
1.0	8.38	4.87	3.44	41.11
1.5	8.50	4.55	3.65	42.91
2.0	8.38	4.74	3.38	40.33
2.5	8.50	5.19	3.18	37.47

ตารางที่ ข-37 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Cu^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)				
	Cu^{2+}	Cu^{2+}	Cu^{2+}	Cu^{2+}	Cu^{2+}
	0.1g/L	0.2g/L	0.3g/L	0.4g/L	0.5g/L
0	1.50	1.63	1.52	1.63	1.5
2	4.13	4.25	5.00	4.50	3.6
4	6.75	7.38	7.25	6.75	5.6
6	8.00	8.00	7.88	8.38	7.4
8	8.63	8.63	8.38	8.50	8.0

ตารางที่ ข-38 ปริมาณลิพิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Cu^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Lipid (g/L)				
	Cu^{2+}	Cu^{2+}	Cu^{2+}	Cu^{2+}	Cu^{2+}
	0.1g/L	0.2g/L	0.3g/L	0.4g/L	0.5g/L
0	0.03	0.03	0.05	0.05	0.0
2	0.31	0.26	0.29	0.28	0.2
4	0.90	0.93	1.18	0.81	0.6
6	1.56	1.39	1.82	1.69	1.4
8	3.33	3.55	3.72	3.55	3.2

ตารางที่ ข-39 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และ ปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Cu^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของ Cu^{2+} (g/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)
0.1	8.63	4.57	3.20	37.05
0.2	8.63	4.69	3.40	39.47
0.3	8.38	5.08	3.56	42.54
0.4	8.88	4.62	3.52	39.67
0.5	8.00	4.92	3.04	37.95

ตารางที่ ข-40 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Biomass) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Fe^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Biomass (g/L)				
	Fe^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{2+}
	12mg/L	14mg/L	16mg/L	18mg/L	20mg/L
0	1.25	1.38	1.31	1.25	1.12
2	3.50	4.50	4.75	3.63	4.38
4	6.13	5.75	7.00	6.13	5.75
6	6.75	7.13	7.38	7.13	7.38
8	8.00	8.38	8.75	7.88	8.38

ตารางที่ ข-41 ปริมาณลิปิดของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Fe^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

เวลา (วัน)	Lipid (g/L)				
	Fe^{2+} 12mg/L	Fe^{2+} 14mg/L	Fe^{2+} 16mg/L	Fe^{2+} 18mg/L	Fe^{2+} 20mg/L
0	0.02	0.05	0.02	0.05	0.02
2	0.24	0.36	0.36	0.21	0.24
4	0.67	0.77	1.03	1.02	0.77
6	1.50	1.72	1.57	1.34	1.77
8	3.26	3.42	3.86	3.65	3.55

ตารางที่ ข-42 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Biomass) ปริมาณโปรตีน ปริมาณลิปิด (g/L) และปริมาณลิปิด (lipid content, %) ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ไฮโซเลท YU5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 80g/L เมื่อใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และแปรผันปริมาณ Fe^{2+} ที่ค่าต่างๆ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

ความเข้มข้นของ Fe^{2+} (g/L)	Biomass (g/L)	Protein (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid content (%DCW)
12	8.50	4.68	2.99	35.23
14	8.25	4.87	3.16	38.26
16	8.75	4.96	3.70	42.24
18	7.88	4.82	3.50	44.48
20	8.38	4.59	3.40	40.60

ภาคผนวก ค การเผยแพร่ผลงานวิจัย

การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการภายในประเทศ

Leesing, R., Srinophakun, P., Laoteng, K. (2009). Isolation and optimization of microbial lipid production by locally oleaginous yeast isolated from soil samples. Poster presentation, ในการประชุมประจำปี “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ครั้งที่ 9, 15-17 ตุลาคม 2552 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์บีช ชะอำ เพชรบุรี



Isolation and optimization of microbial lipid production by the oleaginous yeast isolated from soil samplesLeesing, R.^{1*}, Srinophakun, P.², Laoteng, K.³¹*Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*²*Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok 10190, Thailand*³*Biochemical Engineering and Pilot Plant Research and Development Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) at King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10150, Thailand***Abstract**

The aim of this study was to isolate the oleaginous yeast and to produce single cell oils for used as the potential feedstock for biodiesel production. One hundred and fifty-five of yeast isolates were isolated from 101 soil samples, after enrichment on high glucose medium. Then, the screening of oleaginous yeast was done on nitrogen-limiting medium at 30°C. The thirty-seven isolates were screened and preliminary defined as oleaginous yeast with lipid accumulation more than 20% of cellular dry weight. Among 37 isolates, eleven isolates were tested for their potentiality to produce microbial lipid. Three potential isolates were further selected, and isolate YU5/2 displayed the most potentials ability, with lipid accumulation at 41.48% of cellular dry weight. To enhance the microbial lipid production by isolate YU5/2, the fermentation parameters were optimized, and the optimal conditions for lipid accumulation were obtained as follows: glucose as carbon source 80 g/L; (NH₄)₂SO₄ as inorganic nitrogen sources at 0.1 g/L; initial pH of 5.0; cultivated for 8 day at 30°C and supplement with 25 mg/L CaCl₂, 0.05 mg/L MnCl₂, 4.0 mg/L ZnSO₄, 1.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.3 mg/L CuSO₄, 18 mg/L FeSO₄. Under these conditions, yeast isolate YU5/2 accumulated lipids up to 44.48% on a cellular dry weight basis with biomass yield of 7.88 g/L, and the corresponding lipid productivity reached 3.50 g/L.

Keywords: oleaginous yeast, microbial lipid, biodiesel

*Corresponding author.

Tel.: 0-4320-2377; Fax: 0-4320-2377

E-mail: ratlee@kku.ac.th

PJ-ENG-G11

ISOLATION AND OPTIMIZATION OF MICROBIAL LIPID PRODUCTION BY LOCALLY OLEAGINOUS YEAST ISOLATED FROM SOIL SAMPLES

Leestng, R.¹, Srinophakun, P.², Laoteng, K.³¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002²Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok, Thailand 10190³Biochemical Engineering and Pilot Plant Research and Development Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) at King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand 10150

*corresponding author; e-mail: ratleed@kku.ac.th

OBJECTIVE

The objective of this study was to isolate the oleaginous yeast from soil samples and to produce lipids (oils) for used as the potential feedstock for biodiesel production.

INTRODUCTION

Microbial oils, also be referred to as single cell oils (SCOs), are produced by oleaginous microorganisms involving bacteria, yeasts and algae, which have ability to accumulate lipids over 20 % of their biomass. Microbial oils are now believed as a promising potential feedstock for biodiesel production due to their similar composition of fatty acids to that of vegetable oils (1). Compared with the production of vegetable oils, the culture of oleaginous microorganisms is affected neither by seasons nor by climates. In addition, oleaginous microorganisms can grow well on a variety of substrates, even inexpensive material (2, 3), thus lowering the cost of oils.

MATERIALS & METHODS

The locally yeasts were isolated from 101 soil samples using glucose-enrichment medium and incubated at 30°C for 48 h. Then, the isolate colonies of yeasts were further screened for their lipid-producing ability by using nitrogen-limiting medium (glucose 80 g/L, glucose, 3 g/L yeast extract, 3 g/L peptone) and incubated at 30 °C (Figure 1). The isolated yeast were investigated for cellular lipid accumulation in 250-mL Erlenmeyer flask containing 50-mL of nitrogen-limiting medium, incubated in an incubator shaker at 130 rpm, 30°C. Cell growth was measured by cell dry weight. Lipid and glucose were determined with the method of Rhee and Know (1959) and Miller (1959), respectively.



Figure 1 : Isolation of the locally oleaginous yeast; Enrichment (A) and streak plate technique (B), lipid production by isolated yeasts in an incubator shaker (C).

RESULTS

One hundred and fifty-five of yeast isolates were isolated from 101 soil samples, after enrichment on high glucose medium. Then, the thirty-seven isolates were screened and preliminary defined as oleaginous yeast with lipid accumulation more than 20% of cellular dry weight (data ellipsis). Among 37 isolates, eleven isolates were tested for their potential ability to produce microbial lipid. Three potential isolates, namely YK36.1, YU5/2 and YU12.1 (Figure 2), were further selected, and isolate YU5/2 displayed the most potentials ability, with lipid accumulation at 41.48% of cell dry weight. The time course of yeasts cell growth, glucose utilization and lipid production of isolate YK36.4, YU5/2 and YU12.1 were shown in Figure 3. It is apparent that glucose was used mainly for cell growth at the beginning of cultivation.

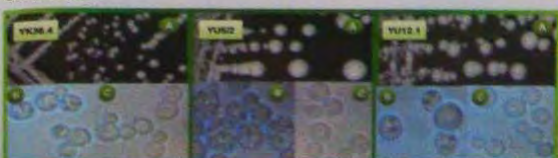


Figure 2 : Colonial morphology (A) of yeast isolates YK36.4, YU5/2 and YU12.1. Yeast cells cultivated on nitrogen-limiting medium (B); YM medium (C) under microscopy. B; the cells were full of oil droplets. C: almost no oil droplets were observed in yeast cells.



Figure 3 : Time course of cell growth and lipid accumulation in yeast YK36.4 (A), YU5/2 (B) and YU12.1 (C) and comparison of biomass (g/L), Lipid (g/L) and cellular lipid content (%) of yeast isolates YK36.4, YU5/2 and YU12.1 (D).

To enhance the microbial lipid production by isolate YU5/2, the fermentation parameters were optimized, and the optimal conditions for lipid accumulation were obtained as follows: glucose at 80 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as inorganic nitrogen source at 0.1 g/L; initial pH of 5.0; cultivated for day at 30°C and supplement with 25 mg/L CaCl_2 , 0.05 mg/L MnCl_2 , 4.0 mg/L ZnSO_4 , 1.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg/L CuSO_4 , 18 mg/L FeSO_4 (Figure 4). Under these conditions, yeast isolate YU5/2 accumulated lipids up to 44.48% on cellular dry weight basis with biomass yield of 7.88 g/L, and the corresponding lipid productivity reached 0.985 g/L/d.

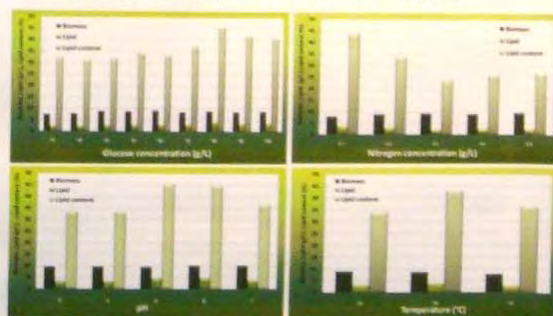


Figure 4 : Biomass, lipid and lipid content (%) of yeast isolate YU5/2 when grown on nitrogen-limiting medium with different culture conditions.

CONCLUSION & DISCUSSION

After the preliminary screening on three yeast isolates, it was found that isolate YU5/2 grows extremely well and accumulated high content of lipids to produce microbial lipids using glucose as sole carbon source under nitrogen-limited culture conditions. The culture condition of isolate YU5/2 (pH, cultivating time, medium composition, etc.) was optimized then this isolate was shown to have ability to accumulate lipids over 40% (w/w) based on dry cell weight. In future works, fatty acid profiles of YU5/2 cellular lipid will be investigated, then biodiesel production will be studied.

REFERENCES

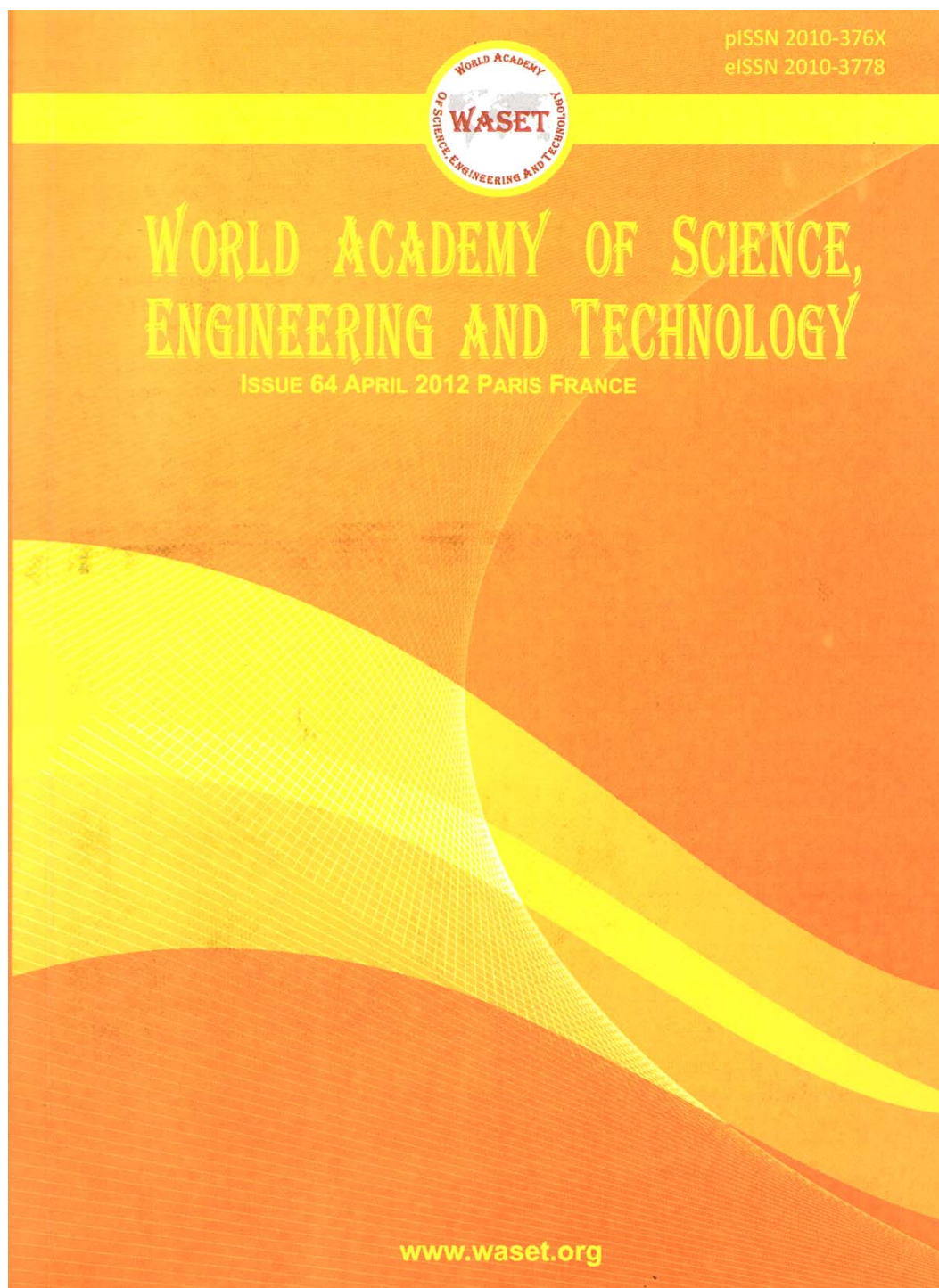
1. Li, Y., Zhao, Z., Bai, F. (2007). *Enzyme Microbiol. Technol.* 41: 312-317.
2. Xue, F., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. (2006). *Process Biochem.* 41:1699-1702.
3. Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Gueblitz, G.M. (2008). *Bioresour. Technol.* 99, 3051-3056.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Thailand Research Fund (TRF) (Grant No. MRG5180251) for financial support.

การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการในต่างประเทศ

Papone, T., Kookkhuntod, S., **Leesing, R.** (2012). Microbial Oil Production by Monoculture and Mixed Cultures of Microalgae and Oleaginous Yeasts using Sugarcane Juice as Substrate. World Academy of Science, Engineering and Technology 64 2012: 1127–1131. <https://www.waset.org/journals/waset/v64/v64-214.pdf>



WORLD ACADEMY OF SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY
ISSUE 64, APRIL 2012

Dear Distinguished Delegate,

World Academy of Science, Engineering and Technology Conference is an international scientific forum of distinguished scholars engaged in scientific, engineering and technological research, dedicated to the furtherance of science, engineering and technology. The academic research conference since its inception is at the cutting edge of international nonprofit scientific, engineering and technological progress to promoting excellence in science.

The conference plays an influential role in science and promotes developments in science, engineering and technology in a wide range of ways. The conference aims to foster research in the area of science and technology and its impact to mainstream human activities. Specifically, it serves as a venue for discussion and exchange of ideas on current issues in science and technology.

All full paper submissions to the conference are peer reviewed & refereed and evaluated based on originality, research content, and correctness, relevance to contributions, and readability. In this context, the full paper submissions are chosen based on technical merit, interest, applicability, and how well they fit a coherent and balanced technical program. The accepted full papers after rigorous peer reviewing process have been published in the refereed international conference proceedings.

INTERNATIONAL SCIENTIFIC COMMITTEE

Alexander Vaninsky, USA
Mathematics Department
Hostos Community College, CUNY, USA

Arkady Bolotin, IL
Ben-Gurion University of the Negev
Beersheba, Israel

Byoung-Tak Zhang, KR
School of Computer Science and Engineering
Seoul National University, Seoul, Korea

Chanseng He, USA
Department of Geography
Western Michigan University, USA

Christos Grecos, UK
School of Computing
University of West Of Scotland, UK

Edgardo Bucciarelli, IT
Department of Quantitative Methods and Economic Theory,
University of Chieti-Pescara - Italy

Eric T T Wong, HK
Department of Mechanical Engineering
The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong

James A. Nelson, USA
Department of Accounting and Information Systems
New Mexico State University

Karen Armstrong, CA
York University
Faculty of Education, Canada

Kenan Matzawje, AU
School of Computing and Mathematics
University of Western Sydney, Australia

Kenneth Revett, UK
University of Westminster
Harrow School of Computer Science, London, UK

Mikhail E. Semenov
Department of Higher Mathematics and Mathematical
Physics Tomsk Polytechnic University, Russia, RU

Miloš Šeda, CZ
Brno University of Technology
Institute of Automation and Computer Science, CZ

Mohammad Siddique, USA
Department of Mathematics and Computer Science,
Fayetteville State University, USA

Omar J. Khan, USA
Maine Business School
University of Maine, USA

Peter Pivonka, AU
Melbourne School Of Engineering
Department of Biomedical Engineering, AU

Prabhat K. Mahanti, CA
Department of Computer Science and Applied Statistics,
University of New Brunswick, Canada

Quoc-Nam Tran, USA
Lamar (Texas State) University
Beaumont, Texas, USA

S. M. A. Burney, PK
Department of Computer Science
University of Karachi, Pakistan

Wang Zhigang, USA
University of California, Davis
Mechanical & Aeronautical Engineering, USA

Zarita Zainuddin, MY
School of Mathematical Sciences
Universiti Sains Malaysia

Zhanna Mingaleva, RU
Faculty of Economics
Perm State University, Russia

Microbial Oil Production by Monoculture and Mixed Cultures of Microalgae and Oleaginous Yeasts using Sugarcane Juice as Substrate

Thidarat Papone, Supaporn Kookkhunthod, Ratanaporn Leesing

Abstract—Monoculture and mixed cultures of microalgae and the oleaginous yeast for microbial oil productions were investigated using sugarcane juice as carbon substrate. The monoculture of yeast *Torulaspora malleae* Y30, *Torulaspora globosa* YU5/2 grew faster than that of microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2. In monoculture of *T. malleae* Y30, a biomass of 8.267g/L with lipid yield of 0.920g/L were obtained, while 8.333g/L of biomass with lipid yield of 1.141g/L were obtained for monoculture of *T. globosa* YU5/2. A biomass of 1.933g/L with lipid yield of 0.052g/L was found for monoculture of *Chlorella* sp. KKU-S2. The biomass concentration in the mixed culture of the oleaginous yeast with microalgae increased faster and was higher compared with that in the monocultures. A biomass of 8.733g/L with lipid yield of 1.564g/L was obtained for a mixed culture of *T. malleae* Y30 with *Chlorella* sp. KKU-S2, while 8.010g/L of biomass with lipid yield of 2.424g/L was found for mixed culture of *T. globosa* YU5/2 with *Chlorella* sp. KKU-S2. Maximum cell yield coefficient ($Y_{X/S}$, g/L) was found of 0.323 in monoculture of *Chlorella* sp. KKU-S2 but low level of both specific yield of lipid ($Y_{P/X}$, g lipid/g cells) of 0.027 and volumetric lipid production rate (Q_P , g/L/d) of 0.003 were observed. While, maximum $Y_{P/X}$ (0.303), Q_P (0.105) and maximum process product yield ($Y_{P/S}$, 0.061) were obtained in mixed culture of *T. globosa* YU5/2 with *Chlorella* sp. KKU-S2. The results obtained from the study shows that mixed culture of yeast with microalgae is a desirable cultivation process for microbial oil production.

Keywords—Microbial oil, *Chlorella* sp. KKU-S2, *Torulaspora malleae* Y30, *Torulaspora globosa* YU5/2, mixed culture, biodiesel.

I. INTRODUCTION

CURRENT biodiesel production methods require the increasing amounts of arable land which compete with terrestrial fuel crops, heightening concern over food affordability. Microorganisms offer a unique alternative as it does not compete with agricultural food production. Microbial oils, lipid produced from many oleaginous microorganisms involving yeasts, moulds, and microalgae, which have ability to accumulate lipids over 20 % of their biomass, are seen as non-food feedstock promising candidates for the production of biodiesel because of their similar fatty acid composition to that of vegetable oils, the culture of these microbe species is affected neither by seasons nor by climates and can accumulate lipids within a short period of time as well as grow well on a variety of substrates [1, 2]. Microalgae have the potential to generate significant quantities of biomass and oil suitable for conversion to biodiesel.

Microalgae may assume many types of metabolisms, such as photoautotrophic, heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic growths [3]. Mixotrophic cultivation is when microalgae undergo photosynthesis and use both organic compounds and inorganic carbon (CO_2) as a carbon source for growth. Microalgae assimilate organic compounds and CO_2 as a carbon source, and the CO_2 released by microalgae via respiration will be trapped and reused under phototrophic cultivation [3, 4].

Many microalgal species can be induced to accumulate substantial contents of lipids. The cellular lipid content in microalgae reaches 75% in *Botryococcus braunii*, but is associated with a low productivity of biomass [5]. The microalgae *Chlorella* sp., especially *C. protothecoides* and *C. vulgaris* are two widely available microalgae strains in the commercial applications. They showed great potentials as future industrial biodiesel producers due to their high growth rate, and their high oil contents and they can be cultured both under photoautotrophic and heterotrophic growths. However, the locally microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2 can grow under photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions and accumulates much higher production of lipids, and the components of fatty acid from extracted lipid were palmitic acid, stearic acid, oleic acid and linoleic acid which similar to vegetable oils and suitable to biodiesel production [6, 7, 8].

In the last decade there is a great attention on oleaginous yeasts because some of them are capable of accumulating large amounts of cellular lipids with characteristics similar to vegetable oil and it also has a high growth rate and can be cultured in a single medium with low cost substrate [9]. Some oleaginous yeast strains, such as *Rhodospiridium* sp., *Rhodotorula* sp., can accumulate intracellular lipids to level exceeding 70% of their biomass under nutrient limitation condition [10]. Our recent study has proved that locally oleaginous yeast *Torulaspora malleae* Y30 and *Torulaspora globosa* YU5/2 can grow well and accumulate lipid efficiently not only on glucose but also on sugarcane molasses and three major constituent fatty acids of lipids were palmitic acid, stearic acid, and oleic acid that are comparable to vegetable oils [11, 12].

However, to expand this novel feedstock, research and development is needed in several domains, from the selection of suitable strains to the optimization of production process as well as the low cost of cultivation process to obtain a large amount of biomass and lipid productivity. Many methods and techniques, such as the use of bioreactors, the heterotrophic and mixotrophic cultures of microalgae, the use of the inexpensive carbon substrates such as industrial wastes and the mixed culture of microorganisms, have been developed to reduce the costs of microbial oil production. Of these techniques, the mixed culture of microorganisms is a

T. Papone is with the Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand (e-mail: annypotter@hotmail.com).

S. Kookkhunthod is with the Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

R. Leesing is with the Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand (Corresponding author, Tel & fax: 0066-43-202-377; e-mail: ratlee@kku.ac.th).

convenient solution for achieving the goals. Mixed cultures of microorganisms are common in natural ecological systems. They are often used for the treatment of agro-industrial wastes, as well as for the production of biomass and bioactive compounds. When using a mixed culture, two or more preselected species of microorganism are synchronously cultivated within the same medium, where these microorganisms can mutually exploit complementary metabolic activities to survive, grow, and reproduce [13]. In the mixed culture of yeast and microalgae, under mixotrophic culture, microalgae could act as an oxygen generator for the yeast while the yeast provided CO_2 to microalgae and both carried out production of microbial oils [4].

Although the fact that growth is prompted when microalgae and oleaginous yeast are mixed culture in the same medium was confirmed in other fields [13, 14], little information for microbial oil preparation is available on mixed cultures of microalgae and yeast being used as biodiesel feedstock. Here, we have developed an approach for the production of microbial oils by mixed culture of microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2 and the oleaginous yeasts *T. maleeae* Y30, *T. globosa* YU5/2 using sugarcane juice as carbon substrate, and compare them with those under monoculture or pure conditions.

Abbreviations

P : Lipid concentration (g/L)
 Q_P : Volumetric lipid production rate (g/L/d)
 Q_S : Volumetric substrate consumption rate (g substrate/L/d)
 Q_X : Volumetric cell mass production rate (g cells/L/d)
 q_P : Specific lipid production rate (g lipid/g cells/d)
 q_S : Specific substrate consumption rate (g substrate/g cells/d)
 S : Substrate concentration (g/L)
 X : Cell mass concentration (g/L)
 $Y_{P/S}$: Process product yield (g lipid/g substrate)
 $Y_{P/X}$: Specific yield of lipid (g lipid/g cells)
 $Y_{X/S}$: Cell yield coefficient (g cells/g substrate)
 μ : Specific growth rate coefficient (1/d)

II. MATERIALS AND METHODS

A. Microorganisms and Culture Conditions

The microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2 isolated from freshwater taken from pond in the area of Khon Kaen province, northeastern Thailand [6], was used for microbial oil production. The seed culture was pre-cultivated onto Bristol's medium supplemented with 20 g/L glucose at 30°C in an incubator shaker at a shaking speed of 150 rpm for 3 days and continuous illuminated from overhead by 80W cool-white fluorescent lamps. The Bristol's medium contained the following components (mg/L): NaNO_3 250, K_2HPO_4 75, KH_2PO_4 175, CaCl_2 25, NaCl 25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75, and FeCl_2 0.3, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, H_3BO_3 0.2, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.06, and pH was adjusted to 6.0 before sterilization.

The oleaginous yeasts *T. maleeae* Y30 and *T. globosa* YU5/2 used in this study were isolated from soil samples taken from forest in the area of Chaiyapoom and Udonthani Provinces Northeastern of Thailand [11, 12]. The seed cultures were cultivated onto Lipid accumulation (LA) medium

supplemented with 20g/L glucose at 30°C in an incubator shaker at a shaking speed of 150 rpm for 1 day. The LA medium was consisted of (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, KH_2PO_4 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, ZnSO_4 0.0044, CaCl_2 0.0025, MnCl_2 0.0005, CuSO_4 0.0003 and yeast extract 0.75 and pH was adjusted to 5.0 before sterilization.

B. Raw Materials

The raw material used in this study was sugarcane juice collected from a local market in Khon Kaen province, Northeastern Thailand. The pre-treated sugarcane juice was mixed with sulfuric acid for final concentration of 2% (v/v). The mixture was treated in water bath at 100°C for 20 min. After cooling, the liquid fraction or sugarcane juice hydrolysate (SJH) was separated by centrifugation in order to remove insoluble particles and stored at 4°C prior to use.

C. Microbial Oil Production by Pure and Mixed Cultures

Batch cultivations were performed in 1000mL Erlenmeyer flasks, each containing 500mL of medium supplemented with treated sugarcane juice or SJH, flasks were inoculated with 10% (v/v) seed culture of yeast or microalgae and cultivated at 30°C in rotary shaker set to 150 rpm under continuous illumination by using 80W cool-white fluorescent lamps. The experiments were performed in form of pure culture of each *T. maleeae* Y30, *T. globosa* YU5/2 and *Chlorella* sp. KKU-S2, mixed culture of *Chlorella* sp. KKU-S2 with *T. maleeae* Y30 and mixed culture of *Chlorella* sp. KKU-S2 with *T. globosa* YU5/2.

D. Analytical Methods

Duplicate samples were analyzed for cell dry weight, and residual glucose. The culture broth (5 mL) was centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. The supernatant was analyzed for glucose concentration according to DNS method [15]. Harvested biomass was washed twice with 5 mL of distilled water and then dried at 90°C to constant weight. The biomass was determined gravimetrically. The total lipids were determined by the modified method of Know and Rhee [16].

E. Determination of Growth Kinetic

In fermentation, variables which are of great relevance to the economic evaluation of biotechnological processes are the cell yield on a substrate ($Y_{X/S}$), specific growth rate (μ), volumetric substrate consumption rate (Q_S), specific substrate consumption rate (q_S), product yield based on substrate ($Y_{P/S}$), specific product yield ($Y_{P/X}$) and volumetric product formation rate (Q_P). All these kinetic parameters have major technological importance in up scaling the fermentation process [17]. Volumetric lipid production rate (Q_P) was determined from a plot between lipids (g/L) and fermentation time, process product yield ($Y_{P/S}$) was determined from dP/dS , and specific product yield ($Y_{P/X}$) was determined using relationship dP/dX , while volumetric rate of substrate consumption (Q_S) was determined from a plot between substrate (g/L) present in the fermentation medium and fermentation time. Volumetric cell mass production rate (Q_X) was determined from a plot of dry cells (g/L) versus time of fermentation (d). The specific growth rate (μ) is the slope

determined by plotting the natural log of biomass versus time for each substrate concentration during the initial phase of exponential growth before the substrate concentration decreases significantly while specific rate of lipid production (q_p) was a multiple of μ and $Y_{P/X}$.

III. RESULTS AND DISCUSSION

The production of microbial oil via pure or monoculture and mixed cultures of the oleaginous yeasts *T. maleseae* Y30, *T. globosa* YU5/2 and microalgae *Chlorella* sp. KKKU-S2 using SJH as carbon substrate by batch cultivations were investigated. Biomass, lipid yield and residue sugar of monoculture and mixed cultures are presented Fig.1 and Table 1. It is apparent that SJH referred to reducing sugar was used mainly for cell growth at the beginning of cell growth phase. The monoculture of *T. maleseae* Y30, *T. globosa* YU5/2 grew faster than that of microalgae *Chlorella* sp. KKKU-S2.

In monoculture of yeast *T. maleseae* Y30, a biomass of 8.267g/L with specific growth rate of 0.352(1/d) and lipid yield of 0.920g/L were obtained, while 8.333g/L of biomass with specific growth rate of 0.353 (1/d) and lipid yield of 1.141g/L were obtained for monoculture of *T. globosa* YU5/2. A biomass of 1.933g/L with specific growth rate of 0.110(1/d) and lipid yield of 0.052g/L were found for monoculture of *Chlorella* sp. KKKU-S2.

The biomass concentration in the mixed culture of the oleaginous yeast with microalgae *Chlorella* sp. KKKU-S2 increased faster and was higher compared with that in the monocultures. A biomass of 8.733g/L with specific growth rate (μ) of 0.361 (1/d) and lipid yield of 1.564g/L were obtained for a mixed culture of yeast *T. maleseae* Y30 with *Chlorella* sp. KKKU-S2, while 8.010g/L of biomass with specific growth rate of 0.347(1/d) and lipid yield of 2.424g/L were found for mixed culture of yeast *T. globosa* YU5/2 with microalgae *Chlorella* sp. KKKU-S2.

Maximum cell yield coefficient ($Y_{X/S}$, g/L) was found of 0.323 in monoculture of microalgae *Chlorella* sp. KKKU-S2 but with low level of both specific yield of lipid ($Y_{P/X}$, g lipid/g cells) of 0.027 and volumetric lipid production rate (Q_p , g/L/d) of 0.003 were observed. While, maximum $Y_{P/X}$, g lipid/g cells and Q_p of 0.303 and 0.105 were obtained, respectively, in mixed culture of yeast *T. globosa* YU5/2 with microalgae *Chlorella* sp. KKKU-S2.

The maximum process product yield ($Y_{P/S}$, 0.061) was obtained from mixed culture of yeast *T. globosa* YU5/2 with microalgae *Chlorella* sp. KKKU-S2, followed by mixed culture of yeast *T. maleseae* Y30 with microalgae *Chlorella* sp. KKKU-S2 ($Y_{P/S}$, 0.039), pure culture of *T. globosa* YU5/2 ($Y_{P/S}$, 0.034), pure culture of *T. maleseae* Y30 ($Y_{P/S}$, 0.026), and pure culture of *Chlorella* sp. KKKU-S2 ($Y_{P/S}$, 0.009).

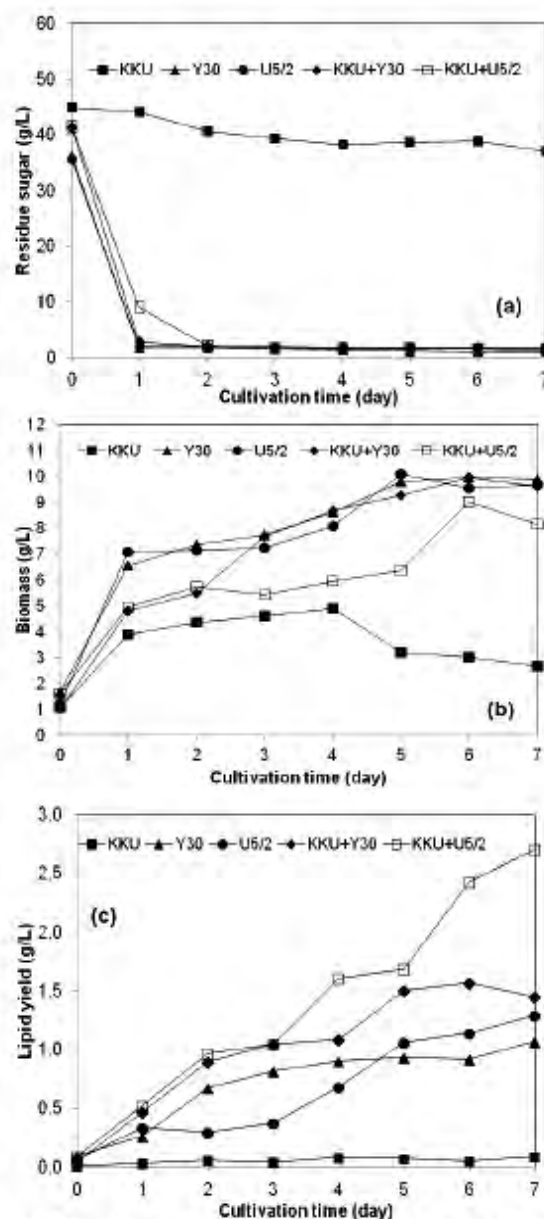


Fig. 1 Residue sugar (a), biomass concentration (b), lipid yield (c) during cultivation of pure and mixed cultures of *T. maleseae* Y30 (Y30), *T. globosa* YU5/2 (U5/2), *Chlorella* sp. KKKU-S2 (KKU) using SJH as carbon substrate at 30°C, for 7 days

It is possible that the microalgae may function as an O_2 producer in the mixed culture and enhance the growth of yeast and the yeast produced CO_2 that could be used by the microalgae under photoautotrophic cultivation. In the mixed culture, the metabolic reactions of both CO_2 release and uptake were combined and complementary [18].

TABLE I
COMPARATIVE FERMENTATION KINETIC PARAMETERS OF BATCH
CULTIVATION OF THE OLEAGINOUS YEASTS AND MICROALGAE ON CULTURE
MEDIUM USING SUGARCANE JUICE AS CARBON SUBSTRATE AT 30°C

Kinetic parameters	Microbial cultures				
	Y30 ¹	U5/2 ²	KKU ³	KKU+Y30 ⁴	KKU+U5/2 ⁵
X	8.267	8.333	1.933	8.733	8.010
P	0.920	1.141	0.052	1.564	2.424
μ	0.352	0.353	0.110	0.361	0.347
Q_t	5.875	5.621	0.996	6.648	6.636
Q_p	0.153	0.190	0.009	0.261	0.404
$Q_{p,r}$	1.378	1.389	0.322	1.456	1.335
T_{lag}	0.235	0.247	0.323	0.219	0.201
T_{max}	0.111	0.137	0.027	0.179	0.303
T_{ps}	0.026	0.034	0.009	0.039	0.061
g_p	0.711	0.675	0.515	0.761	0.829
q_p	0.039	0.048	0.003	0.065	0.105

¹ Pure culture of *T. maiensis* Y30.

² Pure culture of *T. globosa* YU5/2.

³ Pure culture of *Chlorella* sp. KKU-S2.

⁴ Mixed culture of *Chlorella* sp. KKU-S2 with *T. maiensis* Y30.

⁵ Mixed culture of *Chlorella* sp. KKU-S2 with *T. globosa* YU5/2.

Nannochloropsis oculata exhibited increases in biomass and lipid content when the CO₂ concentration supplied was increased [19]; similarly, *Chlorella kessleri* showed a particularly high potential for bio-fixation of CO₂ [20]. When oleaginous microorganisms are grown with an excess of carbon (inorganic and organic carbon) and limited quantity of nitrogen referred to low level of carbon to nitrogen (C/N) ratios, they may accumulate high concentration of cellular lipid. Cultivation of oleaginous microorganisms, with low nitrogen in the medium, results to the decrease of the activity of nicotinamide adenine dinucleotide isocitrate dehydrogenase (NADIDH) then the tricarboxylic acid cycle is repressed, metabolism pathway altered and protein synthesis stopped and lipid accumulation is activated [21]. Photosynthesis generates oxygen and dissolved oxygen levels much greater than the air saturation values inhibit photosynthesis [22]. Furthermore, a high concentration of dissolved oxygen in combination with intense light produces photooxidative damage to microalgal cells [23]. It is therefore desirable to remove CO₂ from the yeast fermentation broth and O₂ from the photosynthetic microalgae broth. The promotion effect on growth in mixed cultures can be attributed to sufficient *in situ* O₂ and CO₂ transitions, since the microalgae acted as an oxygen generator for the oleaginous yeast, while the oleaginous yeast produces CO₂ for the microalgae. As a result, the stresses caused by CO₂ on the yeast and O₂ on the microalgae were eliminated. Thus, the growth conditions were optimized for both species. Additionally, this sufficient *in situ* transition may maintain an O₂/CO₂ balance that enhances the photosynthesis of the microalgae [24]. The obtained result presented that mixed culture of yeast with microalgae is a desirable cultivation process for microbial oil production under mixotrophic cultivation. However, the process product yield ($I_{p,s}$) obtained in batch fermentation by mixed culture of yeast with microalgae quite low, suggesting to difficult for up scaling of microbial lipid production by the microalgae due to high substrate consumption rate. To solve these phenomena, further

fed-batch fermentation should investigated with initial nitrogen-rich medium to obtain high biomass or high cell density at the early stage of cell growth, then high concentration of carbon source will feed onto culture medium for stimulate the cellular lipid accumulation. Xiong et al. [25] reported that cell density of *Chlorella protothecoides* achieved was 16.8 g/L in a 5-L bioreactor for 184 h of cultivation time by performing fed-batch culture with lipid content of 50.3% cell dry weight using glucose as carbon source. Fed-batch fermentation modes have been widely applied for microbial lipid production. Although the research on the production of biodiesel from microbial oil is enormous, this system appears not economically viable in the current environment because it provides higher costs when comparing with conventional fuels but there are many methods to improve the low cost of microbial oil production processes. For example, the more economic carbon source should be employed to take the place of pure glucose or sucrose as substrate such as sweet potato, Jerusalem artichoke, sweet sorghum or other non-food agricultural products, agro-industrial waste residues, i.e. distillery slop [12, 26]. In addition, potential and realistic progress in transforming of lignocellulosic materials to fermentable carbon sources might provide an optimal way to reduce the cost of microbial oils production. Process engineering that leads to a higher lipid production rate and cellular lipid content may also contribute in this regard. Thus, to realize the large-scale production of biodiesel from microbial oils, it was necessary to obtain a large amount of biomass and lipid yield via optimal fermentation process such as mix cultivation, fed-batch fermentation as well as the low cost of cultivation process. The following conclusions can be drawn from this study; the oleaginous yeast *T. globosa* YU5/2 and microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2 use sugarcane juice as organic nutrients efficiently in mixed culture under mixotrophic growth. The biomass productivity and lipid yield are notably enhanced in comparison with monoculture. To our knowledge this is the unique report about the production of microbial oil from *T. globosa* YU5/2 and *Chlorella* sp. KKU-S2 via mixed culture using sugarcane juice as substrate. In further works, increasing of biomass and lipid yield will be investigated in a 10L reactor via mix cultivation of mixotrophic microalgae with yeast fermentation using inexpensive raw materials by batch and fed-batch cultivation modes and fatty acids profile of mixed microbial lipid of yeast with microalgae will be studied, then completed with the production of biodiesel from microbial oil via one-step and two-step transesterification reactions.

ACKNOWLEDGMENT

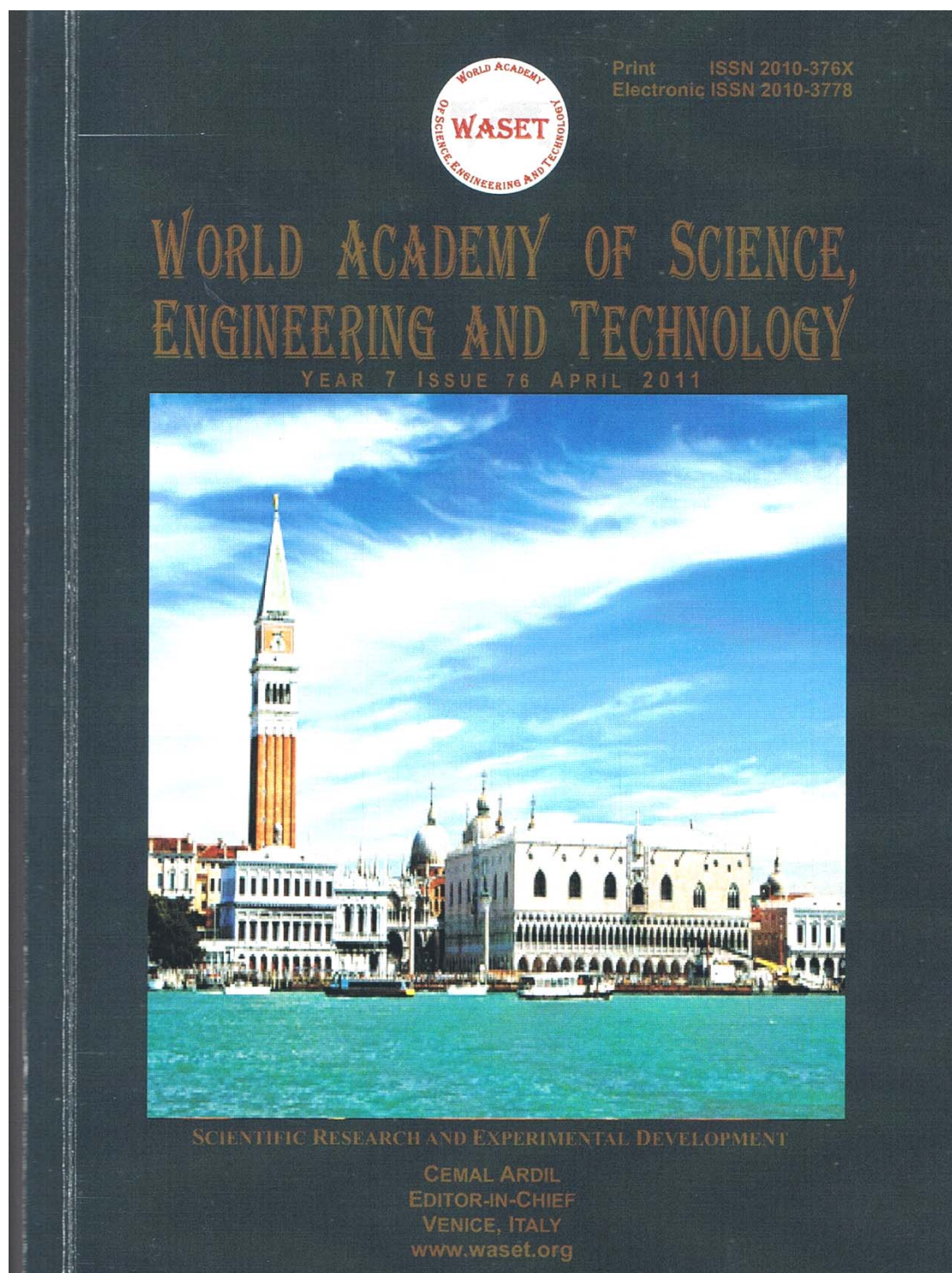
This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Biofuel Cluster of Khon Kaen University and Human Resource Development in Science Project, Office of the Higher Education Commission through Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST).

REFERENCES

- [1] Huang, G.H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X.W., and Chen, G. (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl Energy* 87:38–46.
- [2] Chen, C.H., Kuei-Ling Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., Chang, J.S. (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour Technol* 102: 71–81.
- [3] Brennan, L., Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae-a-review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Energy Rev* 14:557–577.
- [4] Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sust Energ Rev* 14: 217–232.
- [5] Metzger, P., Lergau, C. (2005) *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:486–496.
- [6] Leasing, R., Nontaso, N. (2010) Microalgal oil production by green microalgae under heterotrophic cultivation. *KKU Res J* 15 (9): 787–793.
- [7] Leasing, R., Kookkhunthod, S. (2011) Heterotrophic growth of *Chlorella* sp. KKU-S2 for lipid production using molasses as a carbon substrate. Proceedings of the International Conference on Food Engineering and Biotechnology, May 28–29, 2011, Bangkok, Thailand, pp. 87–91.
- [8] Papone, T., Kookkhunthod, S., Leasing, R., (2011) Fed-batch heterotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella* sp. KKU-S2 for lipid production. Proceedings of the 3rd International Conference on STGMS, March 24–25, 2011, Luang Prabang, Lao PDR, p.84.
- [9] Yong-Hong L., Bo, L., Zong-Bao, Z., Feng-Wu, B., (2006) Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese J Biotechnol* 22: 650–656.
- [10] Tehlivets, O., Scheuringer, K. and Kohlwein, S.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1771:255–270.
- [11] Leasing, R., Karaphan, P. (2011) Kinetic growth of the isolated oleaginous yeast for lipid production. *African J Biotechnol* 10 (63): 13867–13877.
- [12] Leasing, R., Baojungharn, R. (2011) Microbial Oil Production by Isolated Oleaginous Yeast *Tarulaspora globosa* YU5/2. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology 76 2011, Venice, Italy, pp 1088–1092.
- [13] O'Reilly, A. M., Scott, J. A. (1995) Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 17:636–646.
- [14] Pisman, T. I., Somova, L. A. (2003) Interaction of a mixed yeast culture in an "autotroph-heterotroph" system with a closed atmosphere cycle and spatially separated components. *Adv. Space Res.* 31:1751–1756.
- [15] Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426–432.
- [16] Kwon, D.Y. and Rhee, J.S. (1986) A Simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J Am Oil Chem Soc* 63:89–92.
- [17] Lee, J.M. (1992) *Biochemical Engineering*. Prentice Hall international, New Jersey.
- [18] Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Tan, T. (2010) A new strategy for lipids production by mix cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*. *Appl Biochem Biotechnol* 160:498–503.
- [19] Richmond, A. (2004) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science.
- [20] Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Chen, C.H., Kuan, T.C., Ong, S.C., Lin, C.S. (2008) Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresour Technol* 99:3389–3396.
- [21] Ratledge C., Wynn, J.P. (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol* 51: 1–51.
- [22] Molina Grima E, Fernández J, Acien Fernández FG, Chisti Y. (2001) Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J Biotechnol* 92:113–131.
- [23] Pope, D.H. (1975) Effects of light intensity, oxygen concentration, and carbon dioxide concentration on photosynthesis in algae. *Microb. Ecol.* 2:1–16.
- [24] Dong, Q.L., Zhao, X.M. (2004) In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. *Catal. Today* 98:537–544.
- [25] Xiong, W., Li, X., Xiang, J., and Wu, Q. (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:29–36.
- [26] Zhao, C.H., Zhanga, T., Li, M. and Chia, Z.M. (2010) Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Process Biochem* 45:1121–1126.

Leesing, R., Baojungharn, R. (2011). Microbial Oil Production by Isolated Oleaginous Yeast *Torulaspora globosa* YU5/2. Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology 76 2011, April 27–29, 2011, Venice, Italy, pp 1088–1092.

<http://www.waset.org/journals/waset/v52/v52-158.pdf>



WORLD ACADEMY OF SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY
ISSUE 76, APRIL 2011

Dear Distinguished Delegate,

World Academy of Science, Engineering and Technology Conference is an international scientific forum of distinguished scholars engaged in scientific, engineering and technological research, dedicated to the furtherance of science, engineering and technology. The academic research conference since its inception is at the cutting edge of international nonprofit scientific, engineering and technological progress to promoting excellence in science.

The conference plays an influential role in science and promotes developments in science, engineering and technology in a wide range of ways. The conference aims to foster research in the area of science and technology and its impact to mainstream human activities. Specifically, it serves as a venue for discussion and exchange of ideas on current issues in science and technology.

All full paper submissions to the conference are peer reviewed & refereed and evaluated based on originality, research content, and correctness, relevance to contributions, and readability. In this context, the full paper submissions are chosen based on technical merit, interest, applicability, and how well they fit a coherent and balanced technical program. The accepted full papers after rigorous peer reviewing process have been published in the refereed international conference proceedings.

INTERNATIONAL SCIENTIFIC COMMITTEE

Alexander Vaninsky, USA
Mathematics Department
Hostos Community College, CUNY, USA

Arkady Bolotin, IL
Ben-Gurion University of the Negev
Beersheba, Israel

Byoung-Tak Zhang, KR
School of Computer Science and Engineering
Seoul National University, Seoul, Korea

Chanseng He, USA
Department of Geography
Western Michigan University, USA

Christos Grecos, UK
School of Computing
University of West Of Scotland, UK

Edgardo Bucciarelli, IT
Department of Quantitative Methods and Economic Theory,
University of Chieti-Pescara - Italy

Eric T T Wong, HK
Department of Mechanical Engineering
The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong

Éric Filiol, FR
Ecole Supérieure d'Informatique, d'Electronique et
d'Automatique, France

Frederic Du Burck, FR
Universite Paris-Nord 13
Institut Galilee, France

James. A. Nelson, USA
Department of Accounting and Information Systems
New Mexico State University

Karen Armstrong, CA
York University
Faculty of Education, Canada

Kenan Matawie, AU
School of Computing and Mathematics
University of Western Sydney, Australia

Kenneth Revett, UK
University of Westminster
Harrow School of Computer Science, London, UK

Miloš Šeda, CZ
Brno University of Technology
Institute of Automation and Computer Science, CZ

Mohammad Siddique, USA
Department of Mathematics and Computer Science,
Fayetteville State University, USA

Omar J. Khan, USA
Maine Business School
University of Maine, USA

Peter Pivonka, AU
Melbourne School Of Engineering
Department of Biomedical Engineering, AU

Prabhat K. Mahanti, CA
Department of Computer Science and Applied Statistics,
University of New Brunswick, Canada

Quoc-Nam Tran, USA
Lamar (Texas State) University
Beaumont, Texas, USA

S. M. A. Burney, PK
Department of Computer Science
University of Karachi, Pakistan

Wang Zhigang, USA
University of California, Davis
Mechanical & Aeronautical Engineering, USA

Zarita Zainuddin, MY
School of Mathematical Sciences
Universiti Sains Malaysia

Microbial Oil Production by Isolated Oleaginous Yeast *Torulaspora globosa* YU5/2

Ratanaporn Leasing and Ratanaporn Baojungharn

Abstract—Microbial oil was produced by soil isolated oleaginous yeast YU5/2 in flask-batch fermentation. The yeast was identified by molecular genetics technique based on sequence analysis of the variable D1/D2 domain of the large subunit (26S) ribosomal DNA and it was identified as *Torulaspora globosa*. *T. globosa* YU5/2 supported maximum values of 0.520 g/L/d, 0.472 g lipid/g cells, 4.16 g/L, and 0.156 g/L/d for volumetric lipid production rate, and specific yield of lipid, lipid concentration, and specific rate of lipid production respectively, when culture was performed in nitrogen-limiting medium supplemented with 80g/L glucose. Among the carbon sources tested, maximum cell yield coefficient ($X_{L/S}$, g/L), maximum specific yield of lipid ($Y_{L/X}$, g lipid/g cells) and volumetric lipid production rate (Q_L , g/L/d) were found of 0.728, 0.237, and 0.619, respectively, using sweet potato tubers hydrolysates as carbon source.

Keywords— Microbial oil, oleaginous yeast, *Torulaspora globosa* YU5/2, sweet potato tubers, kinetic parameters.

I. INTRODUCTION

BIODIESEL, mixture of mono-alkyl esters of long chain fatty acids derived from triacylglycerol (TAG), can be produced from renewable resources such as vegetable oil or animal fat, the first generation feedstock [1]. Recently, there has been an increasing interest in looking for new oil feedstock for biodiesel production especially non-food feedstock to avoid the food-fuel conflict. Among them, microbial oils, lipid produced from oleaginous microorganisms are now considered as promising feedstock because of their similar fatty acid composition to that of vegetable oils, the culture of these microbe species is affected neither by seasons nor by climates and can accumulate lipids within a short period of time as well as grow well on a variety of substrates [2, 3]. Some oleaginous yeast strains, such as *Rhodospiridium* sp., *Rhodotorula* sp., can accumulate intracellular lipids to level exceeding 70% of their biomass under nutrient limitation condition [4, 5]. It is known that lipid production requires medium with an excess of sugars and limited other nutrients, usually nitrogen [6]. It was also reported that lipid production by oleaginous yeasts has many

advantages due to their high growth rate, high oil content and the resemblance of their TAG fraction to plant oil [7]. The cost of lipid production currently is relatively high and therefore, it is prudent to search for inexpensive carbon sources, which are nutritionally rich enough to support the growth of the microorganism as well as the production of lipid such as agricultural product or agro-industry by product.

The Monod model is the most widely used and considered the basic equation of an unstructured model [8]. This model introduced the concept of growth-limiting substrate (S), relating the specific growth rate (μ) to the concentration of a single growth-limiting substrate via two parameters, the maximum specific growth rate (μ_{max}), and the Monod's constant or saturation constant (K_s). The growth rate has been shown by Monod to be related to the concentration of substrate medium by the equation:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \quad (1)$$

With the linearization method, the specific growth rate is determined by calculating the difference in the natural log of the biomass concentrations over time, corresponding to the exponential growth phase was plotted:

$$\mu = \frac{\ln(X_t - X_0)}{t} \quad (2)$$

where X_0 is the biomass concentration (g/L) at the beginning of the exponential growth phase, X_t is the biomass concentration at time t .

The Hanes plot is based in based in the linearization of the Monod equation.

$$\left(\frac{S}{\mu}\right) - \left(\frac{K_s}{\mu_{max}}\right) + \left(\frac{1}{\mu_{max}}\right) S \quad (3)$$

The slope is $\left(\frac{1}{\mu_{max}}\right)$ and the intercept is $\left(\frac{K_s}{\mu_{max}}\right)$ of the plot $\left(\frac{S}{\mu}\right)$ versus S .

The method is the most recommended for many different situations, because it minimizes the distortions in

R. Leasing is with the Microbiology Department, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand (corresponding author to provide phone & fax: 0066-43-202-377; e-mail: ratleao@kku.ac.th).

R. Baojungharn is with the Microbiology Department, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

experimental error.

In fermentation, variables which are of great relevance to the economic evaluation of biotechnological processes are the cell yield on a substrate ($X_{f,s}$), specific growth rate (μ), volumetric substrate consumption rate (Q_s), specific substrate consumption rate (q_s), product yield based on substrate ($Y_{p,s}$), specific product yield ($Y_{p,x}$) and volumetric product formation rate (Q_p). All these kinetic parameters have major technological importance in up scaling the fermentation process [8].

The objective of this study is to investigate the effects of different concentration of glucose and different carbon source on growth kinetics of the isolated oleaginous yeast in batch fermentation and to develop a kinetic model incorporating substrate inhibition which would be used to assist the design and scale-up of the cultivation process.

Abbreviations

- K_s : Monod's constant (g/L)
- P : Lipid concentration (g/L)
- Q_p : Volumetric lipid production rate (g/L/d)
- Q_s : Volumetric substrate consumption rate (g substrate/L/d)
- Q_x : Volumetric cell mass production rate (g cells/L/d)
- q_p : Specific rate of lipid production (g lipid/g cells/d)
- q_s : Specific rate of substrate consumption (g substrate/g cells/d)
- S : Substrate concentration (g/L)
- X : Cell mass concentration (g/L)
- $Y_{p,s}$: Process product yield (g lipid/g substrate)
- $Y_{p,x}$: Specific yield of lipid (g lipid/g cells)
- $Y_{x,s}$: Cell yield coefficient (g cells/g substrate)
- μ : Specific growth rate coefficient (1/d)
- μ_{max} : Maximum specific growth rate (1/d)

II. MATERIALS AND METHODS

A. Yeast Strain

Yeast strains YU5/2 was isolated from soil samples collected from a sugarcane field crop, UdonThani Province, Thailand, by enrichment culture technique, briefly, 5.0 g of soil was added into a 250-mL flask containing 50 mL of glucose-enriched medium (g/L): glucose 70, NH_4Cl 2.5, KH_2PO_4 7.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, CaCl_2 0.2, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0005, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7, yeast extract 2.0, and supplemented with streptomycin 100 mg, and incubated in an incubator shaker at 30°C for 2 days with shaking speed at 150 rpm. Ten-fold serial dilutions were made from the enriched-culture broths, 0.1 mL from each dilution ranging from 10^{-2} to 10^{-4} were spread onto YPG agar plates containing (g/L): glucose 20, peptone 10, yeast extract 10, agar 15. The plates were then incubated at 30°C for 2 to 3 days. Yeasts were then isolated by cross streak each isolate on the YPG agar plates, and purified yeast strain was maintained on YPG agar for further study.

B. Identification and Genetic Characterization

In order to identify the isolated yeast, sequence analysis of the variable D1/D2 domain of the large subunit (26S) ribosomal DNA was performed. The divergent D1/D2 domain of 26S rDNA was amplified with primers NL-1 (5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') and NL4 (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') [9]. The polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed in a final volume of 100 μL reaction mixtures conditioning 100 ng of genomic DNA, 2.5 U of Taq polymerase, 20 mM of each dNTP, 40 mM of each primer, 10 mM Tris-HCl and 1.5 mM MgCl_2 . The reaction was pre-denatured at 94°C for 5 min, then repeated for 30 PCR cycles with denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min and extension at 72°C for 2.5 min and then followed by the final extension at 72°C for 10 min. The amplified product was then purified and sequenced. The 26S sequence of the isolated yeast was used for a BLAST search in the EMBL/GenBank database.

C. Lipid Production by Yeast Strains

The seed culture of isolated yeasts were initially cultivated onto YPG broth for 1 day at 30°C, then 5 mL of these culture were transferred to 250-mL flasks with 50 mL of nitrogen-limiting medium containing (g/L): glucose 70, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, ZnSO_4 4.4 mg, CaCl_2 25 mg, MnCl_2 0.5 mg, CuSO_4 0.3 mg, and yeast extract 0.75 and grown at 30°C in an incubator shaker at a shaking speed of 150 rpm for 1 day.

To study of different glucose concentrations, the seed culture (10%, v/v) was inoculated into nitrogen-limiting medium, supplemented with glucose to formulate a medium with an initial concentration of 40, 50, 60, 70, 80 and 90 g/L.

To study the effect of different carbon sources, the seed culture (10%, v/v) was inoculated into nitrogen-limiting medium, supplemented with agro-industry product, sugarcane molasses, sugarcane juice, potato tubers hydrolysate, and sweet potato tubers hydrolysate. Carbon source concentration effect was studied using 30 g/L of total sugar available.

The hydrolysates were prepared by dilute acid hydrolysis and steam explosion, briefly, potato tubers and sweet potato tubers were smashed to 2 cm and mixed with 1.5% HCl to give a mixture with a solid loading of 10% (w/v). The mixture was treated in an autoclave at 121°C for 30 min and the liquid fraction was separated by centrifugation and neutralized by adding 5N NaOH, stored at 4°C prior to use.

D. Analytical Methods

Duplicate samples were analyzed for cell dry weight, and residual glucose. The culture broth (5 mL) was centrifuged at 5,000 rpm for 5 min. The supernatant was analyzed for glucose concentration according to DNS method. Harvested biomass was washed twice with 5 mL of distilled water and then dried at 90°C to constant weight. The biomass was determined gravimetrically.

The total lipids were determined by the modified method of Know and Rhee (1986) with modifications [10]. Lipid content was expressed as gram lipid per gram dry biomass.

E. Determination of Growth Kinetic

Volumetric lipid production rate (Q_p) was determined from a plot between lipids (g/L) and fermentation time, process product yield ($Y_{p/s}$) was determined from dP/dS , and specific product yield ($Y_{p/x}$) was determined using relationship dP/dX , while volumetric rate of substrate consumption (Q_s) was determined from a plot between substrate (g/L) present in the fermentation medium and fermentation time. Volumetric cell mass production rate (Q_x) was determined from a plot of dry cells (g/L) versus time of fermentation (d).

The specific growth rate is the slope determined by plotting the natural log of biomass versus time for each substrate concentration during the initial phase of exponential growth (equation 2) before the substrate concentration decreases significantly while specific rate of lipid production (q_p) was a multiple of μ and $Y_{p/x}$. Then, the determined values of specific growth rate and substrate concentration determined are used to estimate the kinetics parameters, maximum specific growth rate (μ_{max}) and Monod's constant (K_s), with Hanes linear methods (equation 3).

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Identification and Genetic Characterization

BLAST analysis of the 26S rRNA gene sequence of the yeast isolate YU5/2 was revealed it to be a perfect match with that of *Torulaspora globosa* CBS 764 type strain. The alignment and comparison of the 26S sequence of the isolate to the published 26S rRNA sequences belonging to five reference strains of phenotypically close species of *Torulaspora* confirmed the 99% correspondence to the *T. globosa* CBS 764, *T. globosa* SSK9, *T. globosa* SSK8, *T. globosa* LY10, and *Torulaspora* sp. WB17 type strains.

B. Lipid Production by Yeast Strains

The time course of cell growth of two yeasts in nitrogen-limiting medium supplemented with 50g/L glucose were shown in Fig. 1. Apparently glucose was used mainly for cell growth at the beginning of cultivation. Biomass, lipid content and utilized glucose gradually increased and lipid yield reached the maximum of 3.12 g/L or 36.2%CDW were obtained respectively. A slight decrease was found in biomass and lipid yield after day 8 while utilized glucose increased. The possible reason may be that nitrogen source was exhausted and a great deal of glucose consumption led to a decrease of pH, thus inhibiting cell growth. The similar changes were also observed in lipid content of *Trichosporon*

fermentans, after exhaustion of the carbon source in the growth environment [11].

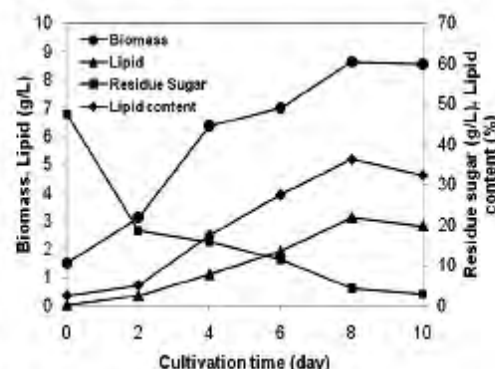


Fig. 1 Kinetic growth of *Torulaspora globosa* YU5/2 on nitrogen-limiting medium supplemented with 50 g/L glucose and 0.2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at 30°C for 10 days.

C. Effect of Glucose Concentration

Batch cultures were investigated to determine the suitable glucose concentration of the initial medium. Therefore, to study of glucose concentrations on cell growth and lipid accumulation, the concentration of glucose at 40, 50, 60, 70, 80 and 90 g/L with 0.2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were investigated. As shown in Fig. 2 and Table 1. No significant difference in cell growth biomass using different glucose concentration. Whereas, the cellular lipid accumulation was quite low at low level of glucose concentration, then showed an increase when glucose concentration increased. Lipid production of *T. globosa* YU5/2 reached the maximum of 4.31 g/L with 45.7%CDW at 80 g/L glucose were obtained. Indeed, glucose concentration has been found to be the major impact factor for oil accumulation by the oleaginous microorganisms [4, 6].

The increase in glucose concentration resulted in a decrease in cell yield coefficient values ($Y_{x/s}$), and an increase in lipid concentration (P). Maximum cell yield coefficient ($Y_{x/s}$, g/L) was found of 0.283 using 40 g/L glucose, whereas maximum specific yield of lipid ($Y_{p/x}$, g lipid/g cells) and volumetric lipid production rate (Q_p , g/L/d) of 0.472 and 0.520 were obtained using 80g/L glucose. Further increase in glucose beyond 80g/L resulted in a slight drop in lipid concentration and biomass, suggesting that a considerable glucose inhibitory effect had occurred. The determined values of specific growth rate and glucose concentration determined are used to estimate the kinetics parameters, maximum specific growth rate (μ_{max}) and Monod's constant or half saturation constant (K_s), with Hanes linear methods. With fitted by linear regression of Hanes plot ($y = 2.6483x - 13.799$,

$R^2=0.96$), μ_{max} of 0.368 (1/d), and K_s of 5.21 g/L were obtained.

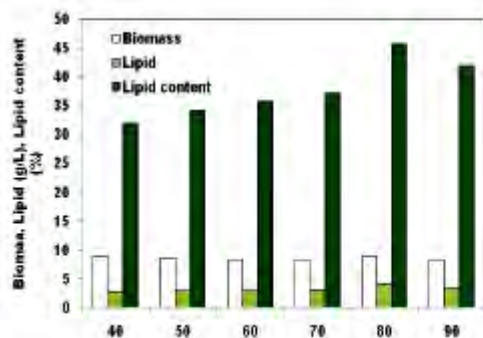


Fig. 2 Effects of glucose concentration on biomass, lipid, and lipid content of *T. globosa* YU5/2 on nitrogen-limiting medium supplemented with different concentration of glucose, at 30°C for 8 days.

TABLE I
COMPARATIVE FERMENTATIVE KINETIC PARAMETERS OF
TOTULOSPORA GLOBOSA YU5/2 ON NITROGEN-LIMITING
MEDIUM SUPPLEMENTED WITH 0.2 G/L $(NH_4)_2SO_4$ (pH 5.0) IN THE
PRESENCE OF DIFFERENT GLUCOSE CONCENTRATION IN
250ML FLASK AT 30°C

Kinetic parameters	Glucose concentration (g/L)					
	40	50	60	70	80	90
λ	8.79	8.69	8.45	8.28	8.81	8.44
μ	2.80	2.97	3.02	3.08	4.16	3.53
μ	0.312	0.318	0.333	0.341	0.331	0.330
Q_p	3.875	4.821	5.714	6.607	8.571	9.464
Q_p	0.035	0.028	0.023	0.019	0.016	0.014
Q_p	0.350	0.372	0.377	0.385	0.520	0.442
Y_{ps}	0.283	0.225	0.185	0.157	0.129	0.111
Y_{ps}	0.319	0.342	0.357	0.372	0.472	0.419
Y_{ps}	0.090	0.077	0.066	0.058	0.061	0.047
q_p	0.441	0.555	0.676	0.798	0.973	1.122
q_p	0.099	0.109	0.119	0.127	0.156	0.138

However, the comparison of process product yield (Y_{ps}) in batch fermentation at high substrate concentration, it was obvious that increase of glucose concentration resulting in decrease of this kinetic parameter, suggesting to difficult for up scaling of lipid production by the oleaginous organisms due to high substrate consumption rate and high concentration of glucose with lower level of nitrogen source could be effect the cell growth, because nitrogen source supported the cell growth, thus, depleted of nitrogen may result to low biomass. To solve these phenomena, further fed-batch fermentation should investigated with initial nitrogen-rich medium to obtain high biomass or high cell density at the early stage of cell growth, then high concentration of carbon source will feed onto culture medium for stimulate the

cellular lipid accumulation. Fed-batch fermentation modes have been widely applied for microbial lipid production [12].

D. Effects of Various Carbon Sources

Glucose is the most commonly used carbon source for microbial oil production. Therefore, it is important to use a low cost carbon source or alternative carbon source instead of glucose in order to reduce the cost of microbial oil production. Thus, different carbon substrates were used for lipid production by *T. globosa* YU5/2. After cultivation on nitrogen-limiting medium supplemented with sugarcane molasses, sugarcane juice, potato tuber hydrolysates, and sweet potato tuber hydrolysates as a carbon substrate with pH 5.0 at 30°C for 6 days, *T. globosa* YU5/2 grew well on several types of carbon source (Fig. 3) and Table 2.

Among the carbon sources tested, potato hydrolysate supported the maximum biomass of 10.75 g/L with lipid content of 19.47 %CDW, followed by sweet potato tuber hydrolysates of 10.43 g/L with lipid content of 23.73%CDW. Maximum cell yield coefficient (Y_{xs} , g/L), maximum specific yield of lipid (Y_{ps} , g lipid/g cells) and volumetric lipid production rate (Q_p , g/L/d) were found of 0.728, 0.237, and 0.619, respectively, using sweet potato hydrolysates as carbon source. However, lower process product yield (Y_{ps} , g lipid/g substrate) of 0.091 was obtained using sugarcane juice as carbon source. The obtained result suggested that oil production from *T. globosa* YU5/2 can be performed with lower cost production process because sweet potato is a cheap and available agriculture product, contains a large amount of starch, which is a suitable feedstock for industrial fermentation. Zhao et al. (2010) found that *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a could accumulate 48.8% (w/w) oil from hydrolysate of inulin and its cell dry weight reached 14.8 g/l during the batch cultivation while it could accumulate 48.6% (w/w) oil and 52.2% (w/w) oil from hydrolysate of extract of Jerusalem artichoke tubers [13].

It has been known that, the costs of microbial oil production are currently higher than those of vegetable oil but there are many methods to improve the low cost of microbial oil production processes. For example, the more economic carbon source should be employed to replace pure glucose such as sweet potato, agro-industrial waste residues. In addition, potential and realistic progress in transforming of lignocelluloses to fermentable carbon sources might provide an optimal way to reduce the cost of microbial oils production. Process engineering that leads to a higher lipid production rate and cellular lipid content may also contribute in this regard. Thus, to realize the large-scale production of biodiesel from microbial oils, it was necessary to obtain a large amount of biomass and lipid content as well as the low cost of cultivation process.

For further study, fatty acids profile of extracted microbial oil of *T. globosa* YU5/2 will be investigate and fed-batch

fermentation using the hydrolysates of sweet potato tubers will be study.

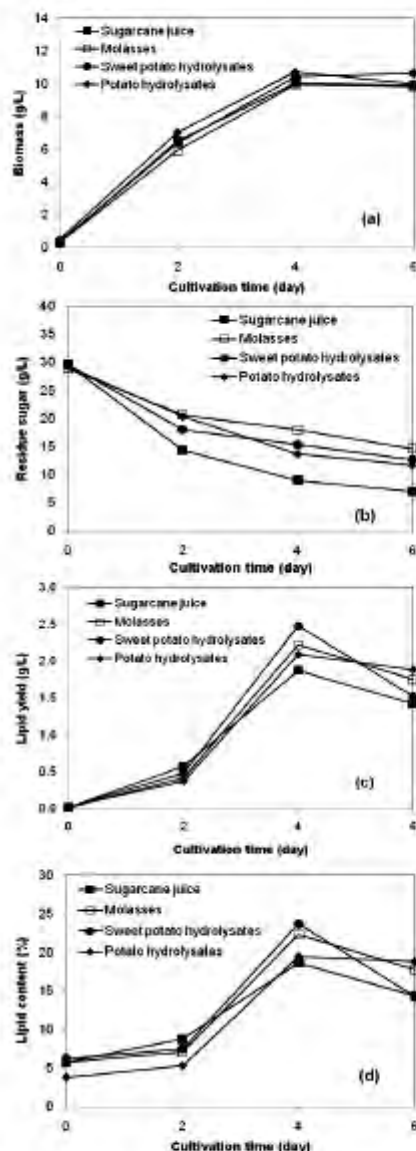


Fig. 3 Effect of different carbon sources on biomass concentration (a), residual sugar (glucose) (b), lipid yield (c), and lipid content (d) during fermentation of *T. globosa* YU5/2.

TABLE II
COMPARATIVE FERMENTATIVE KINETIC PARAMETERS OF
TOTULOSPORA GLOBOSA YU5/2 ON NITROGEN-LIMITING MEDIUM
SUPPLEMENTED WITH 0.2 G/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 5.0) IN THE PRESENCE OF
DIFFERENT CARBON SOURCES AT 30°C

Kinetic parameters	Glucose concentration (g/L)			
	Sugarcane juice	Molasses	Sweet potato hydrolysates	Potato hydrolysates
λ	10.06	9.96	10.43	10.75
P	1.88	2.22	2.48	2.09
μ	0.218	0.259	0.244	0.211
Q_1	5.175	4.275	3.583	3.917
Q_2	2.514	2.489	2.608	2.686
Q_p	0.469	0.555	0.619	0.523
Y_{ps}	0.486	0.582	0.728	0.686
Y_{pd}	0.186	0.223	0.237	0.195
Y_{ps}	0.091	0.130	0.173	0.134
q_s	0.515	0.429	0.344	0.365
q_p	0.041	0.058	0.058	0.041

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Khon Kaen University.

REFERENCES

- [1] Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Biotechnology* 92:405-416.
- [2] Xie, F., Zhang, X., Luo, H. and Yan, T. (2006) A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochem* 41:1699-1702.
- [3] Li, Q., Du, W. and Liu, D. (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:749-756.
- [4] Ratledge, C. and Wynn, J.P. (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 51:1-51.
- [5] Tahlioua, O., Scheuringer, K. and Kohlwein, S.D. (2007) Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771:255-270.
- [6] Evans, C.T. and Ratledge, C. (1984) Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *J Gen Microbiol* 130:1693-1704.
- [7] Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Niu, Q. and Xian, M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy* 34:1-5.
- [8] Lee, J.M. (1992) *Biochemical Engineering*. Prentice Hall international, New Jersey.
- [9] Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (1998) *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 4th Revised and Enlarged Edition. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- [10] Kwon, D.Y. and Rhee, J.S. (1986) A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J Am Oil Chem Soc* 63:89-92.
- [11] Zhai, L.Y., Zeng, M.H. and Wu, H. (2006) Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioreactor Technol* 99:7881-7885.
- [12] Li, Y., Zhao, Z. and Bai, F. (2007) High cell-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microbiology Technology* 41:312-317.
- [13] Zhao, C.H., Zhang, T., Li, M. and Chai, Z.M. (2010) Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TPY15a. *Process Biochemistry* 45:1121-1126.