โครงการ

การเรียนการการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของฟอสฟอรัสต่อการผลิตน้ำมันและปริมาณ palmitoleic acid ในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsfficiens* NG 8.2

ชื่อนิสิต นางสาวณิชากร อมรบุญชัย รหัสประจำตัว 5832319723

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงงาน	ผลของฟอสฟอรัสต่อการผลิตน้ำมันและปริมาณ palmitoleic acid ในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2
โดย	นางสาวณิชากร อมรบุญชัย รหัสนิสิต 5832319723
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

.....หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์)

โครงการการเรียนการการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

ผลของฟอสฟอรัสต่อการผลิตน้ำมันและปริมาณ palmitoleic acid ในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsfficiens* NG 8.2

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร

นิสิตในโครงการ

นางสาวณิชากร อมรบุญชัย

รหัสประจำตัว 5832319723

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

ชื่อโครงการ	ผลของฟอสฟอรัสต่อการผลิตน้ำมันและปริมาณ palmitoleic acid ในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsfficiens* NG 8.2
ชื่อนิสิตผู้นำเสนอโครงการ	นางสาวณิชากร อมรบุญชัย
เลขประจำตัวนิสิต	5832319723
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2 เมื่อแขวนลอยในอาหารผลิตน้ำมันที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ ซึ่งปราศจากฟอสฟอรัส เป็นเวลา 6 วัน ได้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดอยู่ที่ 0.87 กรัม/ลิตร เซลล์สะสมน้ำมัน 13.3880 % (กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) การปรับด่างเกินไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังด้วย $Ca(OH)_2$ ทำให้ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เจริญดีขึ้น การผลิตและสะสมน้ำมันในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังสูงขึ้นเมื่อเติม KH_2PO_4 0.05 กรัม/ลิตร ได้ผลผลิตน้ำมันเพิ่มจาก 1.68 เป็น 1.99 กรัม/ลิตร ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เพิ่มจาก 17.73 เป็น 20.30 % (กรัม/กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง)

คำสำคัญ: ยีสต์ผลิตน้ำมัน ไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Project title Effect of phosphorus on oil production of *Cyberlindnera subsfficiens* NG 8.2 and its palmitoleic acid content

Investigator Ms. Nichakorn Amornbunchai

ID 5832319723

Project advisor Prof. Ancharida Savarajara, Ph.D.

Abstract

Cyberlindnera subsfficiens NG 8.2 resuspended in lipid production medium containing high carbon, low nitrogen without phosphorous supplementation for 6 day gave maximum oil yield 0.87 g/l and oil content 13.39 % (g/g, dry cell weight). Detoxification of starch hydrolysate by $Ca(OH)_2$ increased growth of the *Cyberlindnera subsfficiens* NG 8. . Addition of KH_2PO_4 0.05 g/l into cassava starch hydrolysate increased oil yield from 1.68 to 1.99 g/l and oil content from 17.73 to 20.3 % (g/g, dry cell weight).

Keyword: oleaginous yeast, cassava starch hydrolysate

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาประจำโครงการ

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาช่วยเหลือและให้คำแนะนำ ข้อคิดต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่มอบความรู้ และข้อคิดต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งส่งผลให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยดูแลให้กำลังใจ คอยอบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็น สนับสนุนทางการศึกษาอย่างเต็มที่

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือมาเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอบคุณพี่ๆ ห้อง 1804/15 ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และสอนสิ่งต่าง ๆ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่องานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอบคุณเพื่อนๆ จุลชีววิทยา จุฬาฯ รุ่น 42 พี่ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือ

ท้ายที่สุด ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบโอกาสและประสบการณ์อันทรงคุณค่าในการทำวิจัยนี้

นางสาวณิชากร อมรบุญชัย

สารบัญ

เรื่อง หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญรูปภาพ.....ฉ

สารบัญตาราง.....ช

บทที่ 1 บทนำ

ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ.....1

วัตถุประสงค์ของโครงการ.....7

บทที่ 2 เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....8

เคมีภัณฑ์.....9

เอนไซม์.....10

เชื้อจุลินทรีย์.....10

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

การหาปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนปริมาณมากและไนโตรเจนต่ำ.....11

การเตรียมอาหารผลิตน้ำมัน (lipid production medium).....11

การเตรียมเซลล์ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2.....11

การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำมันของยีสต์เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่มีปริมาณฟอสเฟตแตกต่างกัน.....11

เรื่อง หน้า

การหาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันและการมี palmitoleic acid สัดส่วนสูงในน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง.....12

การเตรียมไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง การปรับด่างเกินด้วย Ca(OH)2 และการเตรียมอาหารผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง. 12

การเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง และอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังแบบผ่านการปรับด่างเกิน.....12

การหาปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันในอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่คัดเลือกได้.....13

วิธีการสกัดน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2.....13

การวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2.....13

การคำนวณหาปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมัน.....13

บทที่ 4 ผลการทดลอง

ผลของปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำของ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2.....14

ผลการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังและอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง.....17

ผลของไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตน้ำมัน.....17

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์.....20

ผลของการเติมฟอสเฟตในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตน้ำมัน.....22

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....25

เอกสารอ้างอิง.....27

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ.....29

ภาคผนวก ข. องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง.....31

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ หน้า

ภาพที่ 1 การอุดตันของหลอดเลือดเนื่องจากคอเลสเตอรอล.....2

ภาพที่ 2 โครงสร้างของกรดปาลมิโตเลอิก (Nestel et al.,1994) 2

ภาพที่ 3 แผนผังการสังเคราะห์กรดไขมัน (Chung Chan et al.,2011) 3

ภาพที่ 4 ผลซีบัคธอร์น และแมคคาเดเมีย.....4

ภาพที่ 5 วิถีชีวสังเคราะห์ไขมันของเซลล์ยีสต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (Patel et al., 2016) 5

ภาพที่ 6 วิถีชีวสังเคราะห์ไขมันของยีสต์ เมื่อเจริญในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสจำกัด (Wang et al., 2018).....6

ภาพที่ 7 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำ.....15

ภาพที่ 8 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำ.....15

ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังและอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง.....18

ภาพที่ 10 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังและอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง.....18

ภาพที่ 11 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังและอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณฟอสเฟตต่างกัน.....23

ภาพที่ 12 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังและอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณฟอสเฟตต่างกัน.....23

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 1 การเจริญและปริมาณการสะสมน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อแขวนลอยในอาหารผลิตน้ำมันที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำ.....16

ตารางที่ 2 การเจริญและปริมาณการสะสมน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อแขวนลอยในอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังชนิดต่าง ๆ.....19

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2.....21

ตารางที่ 4 การเจริญและปริมาณการสะสมน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อแขวนลอยในอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่แปรผันปริมาณฟอสเฟต.....24

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง.....31

ตารางที่5 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังแบบผ่านการปรับด่างเกิน.....31

บทที่1

บทนำ

ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

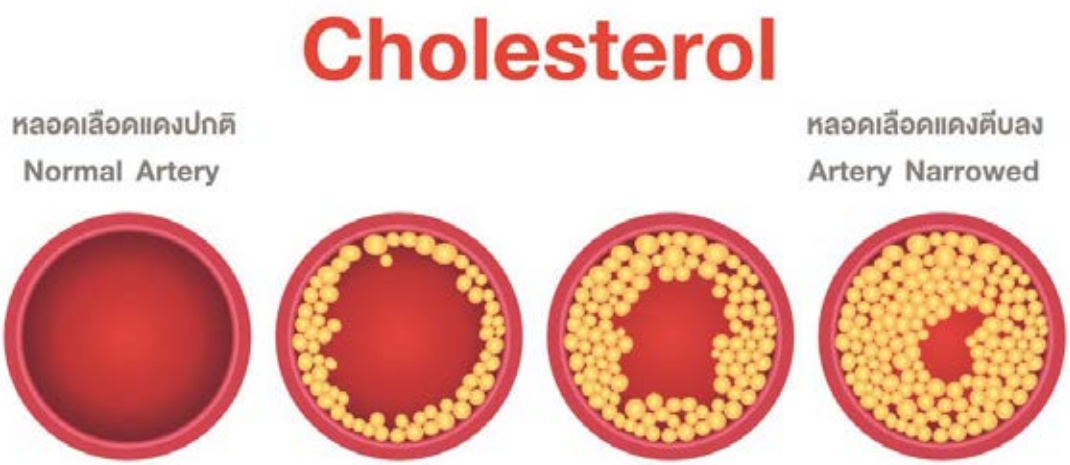
องค์การอนามัยโลก (WHO) เปิดเผยว่า ในปีพ.ศ. 2558 กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 ของคนทั่วโลก โดยมีผู้เสียชีวิตจากโรคหัวใจและหลอดเลือดประมาณ 17.7 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 31ของอัตราการตายทั่วโลก ประเทศไทยจากรายงานสถิติสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข พบอัตราตายจากโรคหลอดเลือดหัวใจต่อประชากร 100,000 คน ปีพ.ศ. 2555 – 2559 เท่ากับ 23.4, 26.9, 27.8, 29.9 และ 32.3 ตามลำดับ และอัตราผู้ป่วยด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจต่อประชากร 100,000 คน ปี 2554 – 2558 เท่ากับ412.70, 427.53, 431.91, 407.70 และ 501.13 ตามลำดับ จากข้อมูลทั้งการตายและป่วยด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจ แสดงให้เห็นว่าโรคหลอดเลือดหัวใจยังคงมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น เพราะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสถานการณ์ปัจจุบันโรคหัวใจและหลอดเลือดยังเป็นสาเหตุของการสูญเสียสุขภาวะในอันดับต้นๆ ของประชากรไทยวัยทำงาน อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากร เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการเสียชีวิตก่อนวัยอันควร ส่งผลกระทบทั้งในระดับบุคคล ครอบครัวสังคม และประเทศชาติ

โรคหัวใจและหลอดเลือดส่วนใหญ่เกิดจากไขมันสะสมในผนังของหลอดเลือด ทำให้เยื่อบุผนังหลอดเลือดชั้นในตำแหน่งนั้นหนาตัวขึ้น หลอดเลือดจึงมีการตีบแคบลง ทำให้เลือดซึ่งนำออกซิเจนไหลผ่านได้น้อยลง ส่งผลให้เลือดไหลไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจได้ไม่เพียงพอ จนเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ซึ่งจะทำให้มีอาการเจ็บหน้าอกเกิดขึ้น หากเกิดการอุดตันของหลอดเลือดเฉียบพลันซึ่งมักเกิดจากคราบไขมันที่สะสมอยู่ที่ผนังของหลอดเลือดชั้นในแตกออกและกลายเป็นลิ่มเลือดจะส่งผลให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน อันนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ หรือเสียชีวิตกะทันหันได้

ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ปัจจัยเสี่ยงที่ไม่สามารถปรับเปลี่ยนได้ ได้แก่ ประวัติครอบครัว หากมีบุคคลในครอบครัวเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ ก็มีโอกาสเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจเพิ่มขึ้น อายุ เมื่ออายุมากขึ้นเกิดการเสื่อมสภาพของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น เพศ เพศชายมีโอกาสเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้มากกว่าเพศหญิง แต่ในเพศหญิงที่หมดประจำเดือนแล้วมีโอกาสเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจใกล้เคียงกับเพศชาย และปัจจัยเสี่ยงที่สามารถปรับเปลี่ยนได้ ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคมีสาเหตุจากพฤติกรรมสุขภาพที่ไม่ถูกต้องโดยอาจมีปัจจัยเสี่ยงเดียวหรือหลายปัจจัยเสี่ยงรวมกันก็ได้ ดังนี้ น้ำหนักเกินและอ้วน ภาวะความดันโลหิตสูง เกณฑ์ในการวินิจฉัย คือ มีค่าสูงกว่าหรือเท่ากับ 140/90 มิลลิเมตรปรอท โดยภาวะความดันโลหิตสูงจะทำให้กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้ายหนาตัวขึ้นซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ความเครียด ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ เป็นต้น

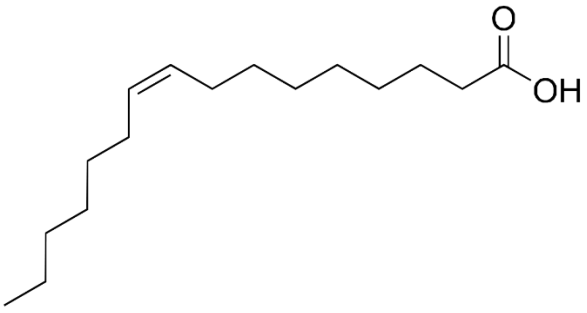
ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ คือ ระดับไขมันในเลือดที่ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดแดงตีบตัน ระดับไขมันในเลือดที่เหมาะสมสำหรับผู้ที่ไม่เป็นโรคหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยงด้านไขมันผิดปกติและควรใช้เป็นค่าสำหรับควบคุมตัวเองในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ คือ ระดับคอเลสเตอรอลรวมน้อยกว่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ระดับแอลดีแอลคอเลสเตอรอล (LDL-C) หรือไขมันตัวร้ายน้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เอชดีแอลคอเลสเตอรอล (HDL-C) หรือไขมันตัวดีมากกว่า 40 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรในผู้หญิง และ

มากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรในผู้ชาย และระดับไตรกลีเซอไรด์น้อยกว่า 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (โรงพยาบาลบำรุงราษฎร์,2002)



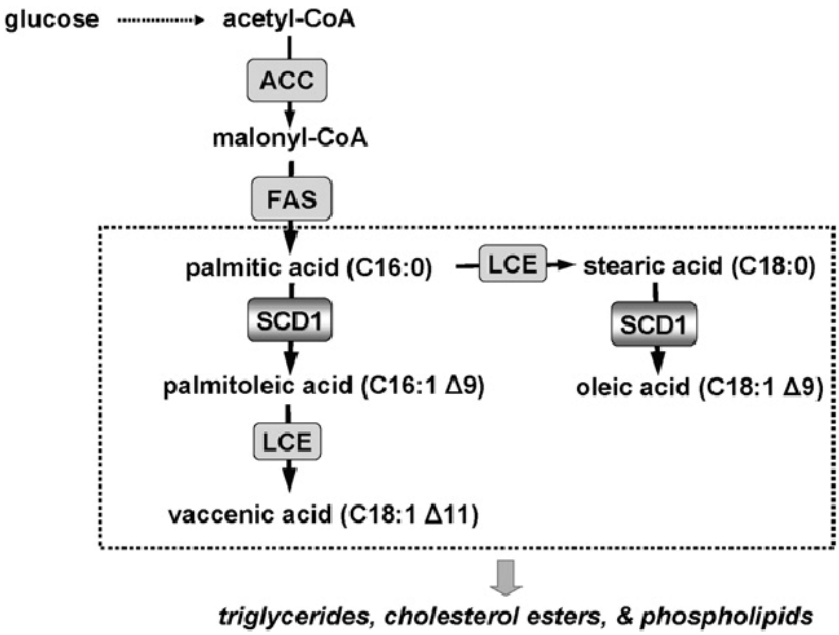
ภาพที่ 1 การอุดตันของหลอดเลือดเนื่องจากคอเลสเตอรอล

ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะค้นหาแนวทางการรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งหนึ่งในแนวทางการรักษาคือ การใช้กรดปาลมิโตเลอิก โดยมีงานวิจัยกล่าวว่า กรดปาลมิโตเลอิกนี้มีส่วนช่วยในการลดไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือดซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดไขมันอุดตันในเส้นเลือดและนำมาสู่โรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด (Passos et al.,2016)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของกรดปาลมิโตเลอิก (Nestel et al.,1994)

กรดปาลมิโตเลอิก (palmitoleic acid) หรือโอเมก้า7 (mega-7 monounsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว สายโซ่ยาวปานกลาง มีคาร์บอน16ตำแหน่งและมีพันธะคู่1ตำแหน่ง มีสูตรทางเคมีคือ $CH_3(CH_2)_5CH = CH (CH_2)_7COOH$ กรดปาลมิโตเลอิกนี้พบได้ในทุกเนื้อเยื่อ แต่ถูกสังเคราะห์และหลั่งจากเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) การสังเคราะห์กรดปาลมิติกเกิดจากการเติมพันธะคู่ (desaturation reaction) ที่กรดปาลมิติก โดยการทำงานของเอนไซม์ stearoyl-CoA



ภาพที่ 3 แผนผังการสังเคราะห์กรดไขมัน (Chung Chan et al.,2011)

นอกจากร่างกายจะสามารถสังเคราะห์กรดปาลิมิโตเลอิกได้เองแล้วยังสามารถพบกรดไขมันชนิดนี้ได้ในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วแมคคาเดเมีย และซีบัคธอร์น แต่การนำผลผลิตทางการเกษตรมาใช้ในการรักษาอาจส่งผลให้ปริมาณการผลิตไม่เพียงพอที่จะตอบสนองความต้องการทั้งด้านอาหารและการรักษา รวมถึงการควบคุมคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรยังทำได้ยากเนื่องจาก คุณภาพของผลผลิตมีการเปลี่ยนไปตามสภาพภูมิอากาศ และฤดูกาลที่ต่างกันไป ด้วยเหตุผลนี้จึงเป็นที่มาของแหล่งน้ำมันจากจุลินทรีย์หรือ single cell oil (SCO) ซึ่งสามารถผลิตได้ตลอดทั้งปีเนื่องจากไม่ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศหรือฤดูกาล และยังใช้พื้นที่ในการผลิตน้อยเมื่อเทียบกับพืชที่ต้องการพื้นที่ในการเพาะปลูกจำนวนมากและต้องการการเก็บเกี่ยวและขนส่งทำให้ต้นทุนของวัตถุดิบมีราคาสูงนำไปสู่ราคากรดปาลมิโตเลอิกที่สูงขึ้น

ก

ข

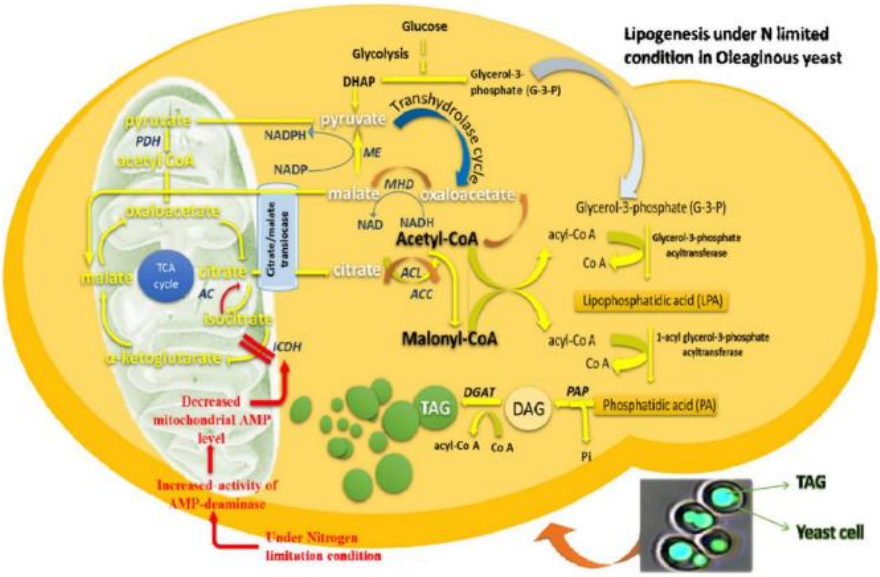
ภาพที่ 4 ก.ผลซีบัคธอร์น ข.แมคคาเดเมีย

จุลินทรีย์น้ำมัน (oleaginous microorganism) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์มากถึง 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Galafassi et al., 2012) แม้ว่าจุลินทรีย์น้ำมันประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายประเภท แต่ด้วยข้อจำกัดของจุลินทรีย์ประเภทต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย มีการสะสมน้ำมันที่บริเวณ outer membrane การสกัดน้ำมันออกมาทำได้ยาก สาหร่ายเซลล์เดียว ต้องใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์เพื่อเป็นพลังงานในการสังเคราะห์น้ำมัน ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ไม่สามารถใช้วัตถุดิบอื่นทดแทนได้ รา อัตราการผลิตน้ำมันช้าและน้ำมันที่ได้ด้อยคุณภาพ ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้จึงเป็นเหตุให้ยีสต์น้ำมัน (oleaginous yeast) เป็นแหล่งน้ำมันที่น่าสนใจและมีศักยภาพที่สุด น้ำมันยีสต์มีโครงสร้างของกรดไขมันเป็นแบบ polyunsaturated fatty acid triacylglycerol หรือ TAG ที่คล้ายกับน้ำมันพืช ยีสต์สามารถใช้แหล่งอาหารได้หลากหลาย เช่น น้ำตาลจากเศษซากวัสดุที่เหลือทิ้งจากการเกษตร (lignocellulose) กลีเซอรอล (glycerol) ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล หรือไฮโดรไลเซตของแป้ง (starch hydrolysate) นอกจากนั้นยีสต์ยังมีวงจรชีวิตสั้น มีอัตราการเจริญเร็ว ความหนาแน่นของเซลล์สูง ไม่ต้องการแสงในการเจริญ ไม่ไวต่อสภาพภูมิอากาศ

ยีสต์น้ำมัน สามารถผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่ยีสต์โดยทั่วไปสามารถผลิตและสะสมน้ำมันได้เพียง 6-8% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอและขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน ยีสต์จะเปลี่ยนการใช้แหล่งคาร์บอนจากการใช้เพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวน เป็นการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการสังเคราะห์ไตเอซิลกลีเซอรอลและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ในสภาพหยดน้ำมัน (oil droplet) ซึ่งโดยทั่วไปมีกรดไขมัน เช่น palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), steric acid (C18:0) และlinoleic acid (C18:2) เป็นองค์ประกอบ (Wasylenko et al., 2015)

ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์สูง ในน้ำมันที่ผลิตมีปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid) เป็นองค์ประกอบสูงถึง 22.25 % นอกจากนี้ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ยังมีอัตราการเจริญเร็ว และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายอีกด้วย (Pranimit, 2017)

วิถีชีวสังเคราะห์น้ำมันภายในเซลล์ยีสต์เริ่มต้นเมื่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเข้าสู่เซลล์และถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวทผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) จากนั้นไพรูเวทจะถูกส่งเข้าไมโทรคอนเดรียและถูกเปลี่ยนเป็น acetyl Co-A เพื่อเข้าวัฏจักรเครบส์ หรือกระบวนการ TCA cycle แต่สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัดเป็นเหตุให้การทำงานของเอนไซม์ mitochondrial isocitrate dehydrogenase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน isocitrate เป็น **α**-ketoglutarate ในวัฏจักรเครบส์ลดลง จึงเกิดการสะสมของ isocitrate และ isocitrate ถูกเปลี่ยนกลับเป็น citrate ทำให้มี citrate ในไมโทรคอนเดรียปริมาณมากจึงถูกส่งออกไปยังไซโตซอล (cytosol) ผ่านช่องทาง citrate/malate antiport และถูกเปลี่ยนเป็น oxaloacetate จากขั้นตอนนี้ทำให้ยีสต์ได้ acetyl Co-A ซึ่ง acetyl Co-A จะถูกเปลี่ยนเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) ในที่สุด นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อปริมาณน้ำมันที่ยีสต์สามารถผลิตได้คือ 1) ชนิดของแหล่งคาร์บอน 2) อุณหภูมิ 3) ความเป็นกรด-ด่าง 4) การให้อากาศ 5) แร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ (Yi-Huamg et al., 2015)



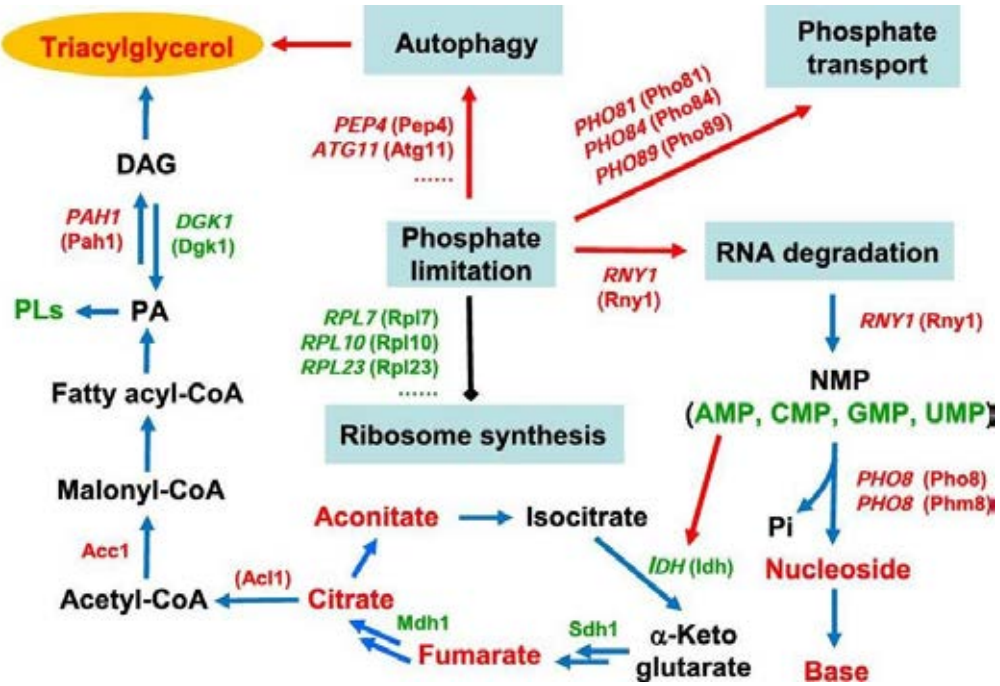
ภาพที่ 5 วิถีชีวสังเคราะห์ไขมันของเซลล์ยีสต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (Patel et al., 2016)

ฟอสฟอรัส (phosphorus, Pi) เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์สารชีวมวลต่าง ๆ ในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสจำกัดส่งผลให้กระบวนที่มีการใช้ฟอสฟอรัส เช่น กระบวนการสังเคราะห์ RNA, ไรโบโซม (ribosome), โปรตีน ทำงานลดลง นอกจากนี้ภายในเซลล์จะมีการย่อยสลาย RNA เพื่อให้ได้ฟอสฟอรัสออกมา มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน (gene) และการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำมัน เช่น เอนไซม์ pyruvate decarboxylase 1 (Pdc1), acetyl-coenzyme A synthetase 1 (Acs1), ATP-citrate synthase 1 (Acl1) ทำหน้าที่เปลี่ยน pyruvate, acetate, citrate เป็น acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการสังเคราะห์ TAG ตามลำดับ เอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase (Acc1) ทำหน้าที่เปลี่ยน acetyl-CoA เป็น malonyl-CoA และยีน *Pah1* เป็นยีนสำหรับสังเคราะห์เอนไซม์ phosphatidic acid phosphohydrolase1 (Pah1) ทำหน้าที่เปลี่ยน phosphatidic acid เป็น diacylglycerol (DAG) และสุดท้ายได้เป็น ไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) (Wang et al., 2018)

การจำกัดปริมาณฟอสฟอรัสในอาหารที่มีคาร์บอนปริมาณมาก หรือ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อฟอสฟอรัส (C/P ratio) สูง ส่งผลให้เซลล์ยีสต์มีการเจริญที่ลดลง และเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำมันมากยิ่งขึ้น ดังนั้นหากจำกัดปริมาณฟอสฟอรัสในอาหารผลิตน้ำมันที่มีคาร์บอนปริมาณมากและขาดแคลนไนโตรเจนซึ่งเป็นอาหารที่ส่งเสริมให้เซลล์ยีสต์ผลิตน้ำมันอยู่แล้ว จึงน่าจะส่งผลให้ยีสต์ผลิตน้ำมันได้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์จะเกิดขึ้นเมื่อมีสภาวะที่มีคาร์บอนปริมาณมากและขาดแคลนไนโตรเจน ดังนั้นอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจึงเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำ เช่น อาหารที่อ้างอิงจากงานวิจัยของ Galafassi และ คณะ ในปี 2012 ซึ่งเป็นอาหารสังเคราะห์มีใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในระดับอุตสาหกรรมเป็นการเพิ่มต้นทุน เนื่องจากกลูโคสมีราคาสูง จึงมีงานวิจัยมากมายสนใจในการนำวัสดุทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในระดับอุตสาหกรรมแทนการใช้กลูโคส

มันสำปะหลัง (cassava) เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยมีผลผลิตปริมาณมากในแต่ละปี (Office of Agricultural Economics, 2017) องค์ประกอบหลักคือแป้งประมาณ 80% ของน้ำหนักแห้ง มีปริมาณโปรตีนน้อย เนื่องจากยีสต์น้ำมันจะผลิตและสะสมน้ำมันเมื่อเจริญในสภาวะที่ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอและขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นแป้งมันสำปะหลังจึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมันเพื่อการผลิตน้ำมัน



ภาพที่ 6 วิถีชีวสังเคราะห์ไขมันของยีสต์ เมื่อเจริญในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสจำกัด (Wang et al., 2018)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อหาปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนปริมาณมากและไนโตรเจนต่ำ

2. เพื่อหาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อฟอสฟอรัสที่เหมาะสมที่สุดต่อการมี palmitoleic acid สัดส่วนสูงในน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเซสของแป้งมันสำปะหลัง

บทที่2

เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A.
2. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated incubator shaker) รุ่น innova® 4300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
3. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG6002-S บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-352 และ ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Japan และรุ่น HV-25 บริษัท HiRaYaMa, Japan
6. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) รุ่น 5922 บริษัท Kubota, Japan
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้สำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก (high speed refrigerated microtube centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
10. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) รุ่น EYELA FD-1 บริษัท Tokyo Rikakikai, Japan
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่นS-20K บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S-UV-VIS บริษัท Thermo Scientific Inc, USA
13. เครื่องวิเคราะห์สารชีวเคมี (biochemistry analyzer) รุ่น 7100 MBS บริษัท YSI, USA
14. ตู้ดูดไอสารระเหยสารเคมี (fume Hood) บริษัท Flexlab, Thailand

15. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) บริษัท Lab service, Thailand

16. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand

17. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Thailand

18. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 5000 ไมโครลิตร บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

19. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น SS40-D บริษัท Grant Instrument, UK

20. อ่างส่งคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น Elma E30H บริษัท Tovatech, USA

เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: HCl) บริษัท Sigma Inc, Germany

2. กลูโคส (D-glucose: $C_6H_{12}O_6$) บริษัท Sigma Inc, Germany

3. คลอโรฟอร์ม (chloroform: $CHCl_3$) บริษัท V.S. Chem house, Bangkok

4. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

6. เพปโทน (peptone) บริษัท Becton Co. Ltd, Germany

7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate: KH_2PO_4) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

8. เมทานอล (methanol: CH_3OH) บริษัท V.S. Chem house, Bangkok

9. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

10. วุ้นผง (agar) บริษัท Becton, USA

11. สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท Becton, Dickinson & Company, USA

12. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Becton Co. Ltd, Germany

13. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate: $(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

เอนไซม์

1. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) 220,000 ยูนิต/มิลลิลิตร บริษัท Siam Victory Chemicals Co. Ltd, Thailand
2. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (**α**-amylase) 120,000 ยูนิต/มิลลิลิตร บริษัท Siam Victory Chemicals Co. Ltd, Thailand

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Cyberlindnera subsufficien*s NG 8.2 คัดแยกได้จากดิน จังหวัดระนอง (Pranimit, 2017)

บทที่3

วิธีการทดลอง

3.1 การหาปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนปริมาณมากและไนโตรเจนต่ำ

3.1.1 การเตรียมอาหารผลิตน้ำมัน (lipid production medium)

อาหารผลิตน้ำมันหรืออาหารที่มีคาร์บอนปริมาณสูงและไนโตรเจนต่ำ เตรียมโดยละลายกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) 50 กรัม สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 0.1 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Mg_2SO4•7H_2O$) 0.5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2•2H_2O$) 0.1 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่า pH เป็น 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการให้ความร้อนไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.1.2 การเตรียมเซลล์ยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2

ย้ายโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM (กลูโคส 10 กรัม/ลิตร สารสกัดจากยีสต์ 3 กรัม/ลิตร สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) 3กรัม/ลิตร เพปโทน (peptone) 5 กรัม/ลิตร และ วุ้นผง 20 กรัม/ลิตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มล. บรรจุในอาร์มฟาสก์ขนาด 250 มล ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เป็น 0.8 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายยีสต์เริ่มต้นจากอาร์มฟาสก์ปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารเหลว YM 45 มล. บรรจุในฟาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 g 5นาที เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.1.3 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำมันของยีสต์เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่มีปริมาณฟอสเฟตแตกต่างกัน

3.1.3.1 การเตรียมอาหารผลิตน้ำมันที่แปรผันปริมาณฟอสเฟต ทำโดยแปรผันปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่เติมในอาหารผลิตน้ำมัน (ข้อ 3.1.1) เป็น 0, 0.01, 0.1 และ 1 กรัม/ลิตร

3.1.3.2 การผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ล้างเซลล์ยีสต์จากข้อ 3.1.2 โดยแขวนลอยในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มล. ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,803 g 5 นาที จำนวน 2 รอบ แขวนลอยเซลล์ที่ได้ในอาหารผลิตน้ำมัน ปริมาตร 10 มล. แล้วย้ายเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ได้ลงในอาหารผลิตน้ำมัน ปริมาตร 40 มล. ที่บรรจุอยู่ในฟาส์กขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 วัน ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,803 g

5 นาที ล้างเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มล. จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มล. ทำให้แห้งแบบเยือกแข็งภายใต้สูญญากาศ แล้วนำไปสกัดน้ำมัน

3.2 การหาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันและการมี palmitoleic acid สัดส่วนสูงในน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง

3.2.1 การเตรียมไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง การปรับด่างเกินด้วย $Ca(OH)_2$ และการเตรียมอาหารผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง

3.2.1.1 การเตรียมไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง ใส่แป้งมันสำปะหลัง 20 กรัม ในขวด Duran ขนาด 250 มล. เติมน้ำกลั่น 100 มล. ปรับค่า pH เป็น 5.8 จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาตร 264 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เขย่าผสมที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับค่า pH เป็น 4.5 จากนั้นเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาตร 90 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เขย่าผสมที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,803 g 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์1

3.2.1.2 การเตรียมไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังแบบผ่านการปรับด่างเกินด้วย $Ca(OH)_2$ ($Ca(OH)_2$ treated starch hydrolysate) นำไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังจากข้อ 3.2.1 (ก่อนกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์1) มาเติม $Ca(OH)_2$ จนค่า pH เท่ากับ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าผสมที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์1

3.2.1.3 การเตรียมอาหารผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง และจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกินด้วย $Ca(OH)_2$ ทำโดยเติมสารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัม/ลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.1 กรัม/ลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 0.1 กรัม/ลิตร ลงไปในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง (ข้อ 3.2.1) และ ไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกินด้วย $Ca(OH)_2$ (ข้อ 3.2.2) ตามลำดับ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการให้ความร้อนไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที

3.2.2 การเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง และอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน

ผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ตามวิธีข้อ 3.1.3.2 แต่แขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแล้วในอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง และอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน

3.2.3 การหาปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำมันในอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่คัดเลือกได้ (ผลจากข้อ 3.2.2)

ผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ตามวิธีข้อ 3.1.3.2 โดยใช้อาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่คัดเลือกได้ (ผลจากข้อ 3.2.2) ที่แปรผันปริมาณ KH_2PO_4 ที่เติมเป็น 0, 0.01 และ 0.05 กรัม/ลิตร

3.3 วิธีการสกัดน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ชั่งเซลล์แห้ง 0.25 กรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติม chloroform : methanol (อัตราส่วน 2:1 v/v) ปริมาตร 5 มล. ปั่นผสม 15 วินาที ทำให้เซลล์แตกโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (f = 37 kHz) นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 9,803 g 40 นาที นำส่วนใสด้านบนมาเติม NaCl (0.73% w/v) เพื่อให้เกิดเป็นสารละลาย chloroform : methanol : water (อัตราส่วน 2: 1: 0.8 v/v/v) ปั่นผสมให้เข้ากัน 15 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 11,104 g 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นล่างใส่หลอดทดลองที่ทราบน้ำหนัก นำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ชั่งน้ำหนักน้ำมันที่ได้

3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

หลังจากแขวนลอยยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันเป็นเวลา 6 วัน ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ ล้างเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,803 g นาน 5 นาที ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30 มล. จำนวน 2 ครั้ง ส่งไปวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันด้วยวิธี Gas-Chromatography ที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การคำนวณหาปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมัน

$$\text{ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ (\% กรัม/กรัม)} : \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์ที่ใช้สกัดน้ำมัน (กรัม)}} \times 100$$

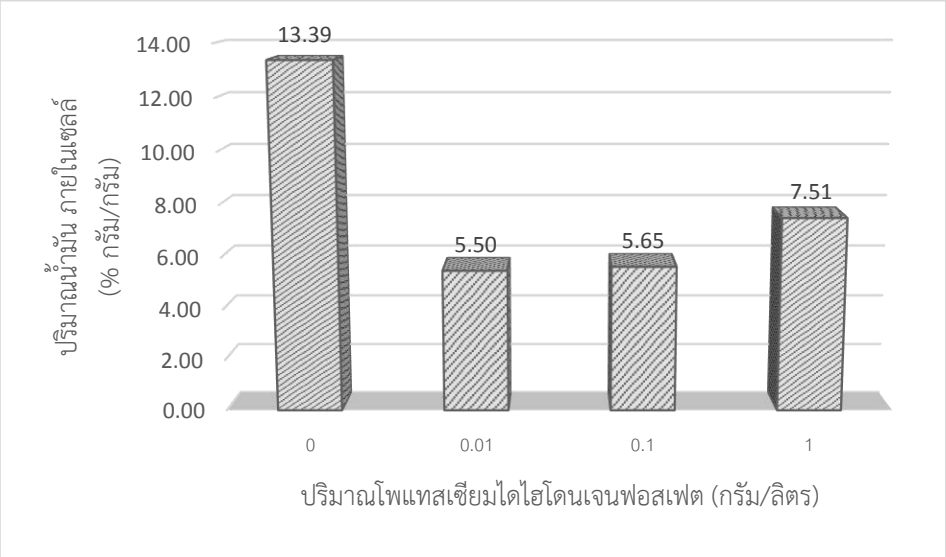
$$\text{ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)} : \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์ที่ใช้ในการสกัดน้ำมัน (กรัม)}} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด (กรัม/ลิตร)}$$

บทที่ 4

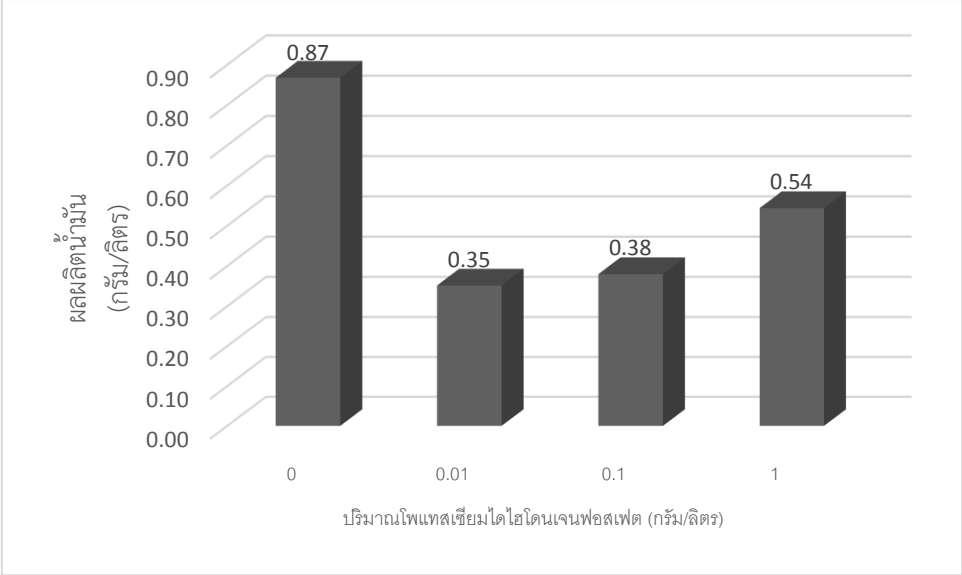
ผลการทดลอง

4.1 ผลของปริมาณฟอสเฟตในอาหารที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำต่อการผลิตน้ำมันของ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

เมื่อแขวนลอยยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำที่แปรผันปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน ทำให้เซลล์แห้งแบบเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ และนำไปสกัดน้ำมัน พบว่าอาหารผลิตน้ำมันที่ไม่เติม KH_2PO_4 มีปริมาณน้ำมันภายในเซลล์สูงสุด 13.39 % (กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) (ภาพที่ 7) และให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 0.87 กรัม/ลิตร (ภาพที่ 8) เซลล์เจริญได้ดีที่สุดในอาหารผลิตน้ำมันที่เติม KH_2PO_4 1 กรัม/ลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 7.15 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 1) ผลผลิตน้ำมันที่ได้รองลงมาตามลำดับ คืออาหารผลิตน้ำมันที่เติม KH_2PO_4 1,0.1 และ 0.01 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 6 และ 7)



ภาพที่ 7 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำซึ่งมีปริมาณฟอสเฟตต่างกัน



ภาพที่ 8 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำซึ่งมีปริมาณฟอสเฟตต่างกัน

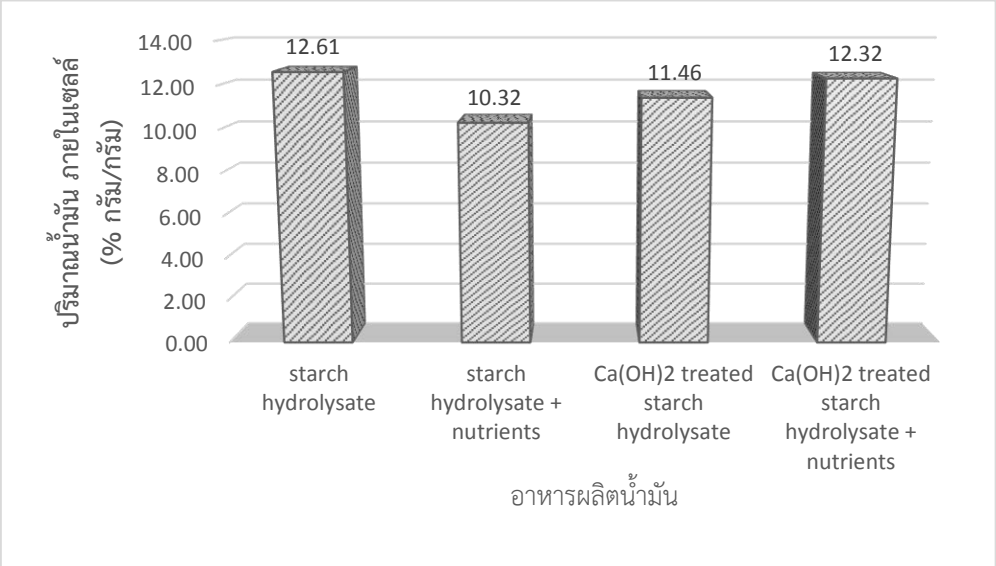
ตารางที่ 1 การเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำ

KH_2PO_4 (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ %(กรัม/กรัม)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)
0	6.46 ± 0.07	13.39 ± 4.70	0.87 ± 0.31
0.01	6.39 ± 0.14	5.50 ± 0.26	0.35 ± 0.02
0.1	6.69 ± 0.21	5.65 ± 1.21	0.38 ± 0.09
1	7.15 ± 1.16	7.51 ± 3.19	0.54 ± 0.25

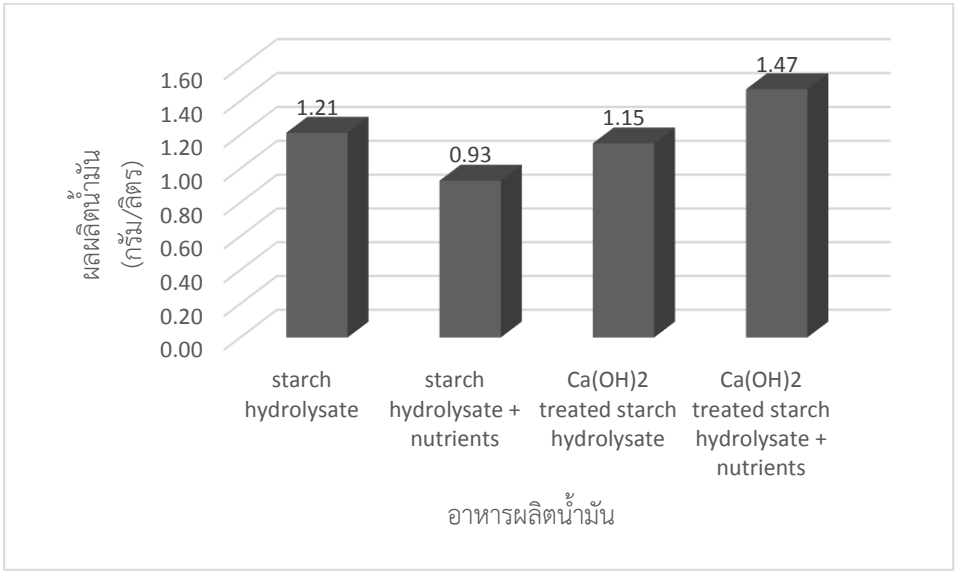
4.2 ผลการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังและอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง

4.2.1 ผลของไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ผลการแขวนลอยยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง ไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน และอาหารผลิตน้ำมันที่เตรียมจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังทั้ง 2 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน ทำให้เซลล์แห้งแบบเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ และนำไปสกัดน้ำมัน พบว่าได้ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์สูงสุด (12.61 % (กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)) ในอาหารผลิตน้ำมันที่เตรียมจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง แต่ได้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด (1.47 กรัม/ลิตร) (ภาพที่ 9) ในอาหารผลิตน้ำมันที่เตรียมจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน รองลงมาคือในโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง (1.21 กรัม/ลิตร) (ภาพที่ 10) และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด (11.76 กรัม/ลิตร) (ตารางที่ 2) ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง แต่เมื่อพิจารณาถึงความยุ่งยากของขั้นตอนการปรับด่างเกินของไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง ตลอดจนต้นทุนของสารอาหารที่ต้องเติมลงไปในการเตรียมอาหารผลิตน้ำมัน จึงเลือกผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังโดยตรง



ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังและอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังชนิดต่าง ๆ



ภาพที่ 10 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังและอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 2 การเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังและอาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังชนิดต่าง ๆ

Lipid production medium	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ %(กรัม/กรัม)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)
Starch hydrolysate	9.60 ± 0.69	12.6147 ± 1.11	1.2123 ± 0.16
Starch hydrolysate + nutrient	8.69 ± 2.74	10.3194 ± 4.84	0.9292 ± 0.64
$Ca(OH)_2$ treated starch hydrolysate	9.96 ± 0.23	11.4556 ± 1.28	1.1493 ± 0.23
$Ca(OH)_2$ treated starch hydrolysate + nutrient	11.76 ± 2.07	12.3244 ± 4.55	1.4692 ± 0.69

4.2.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

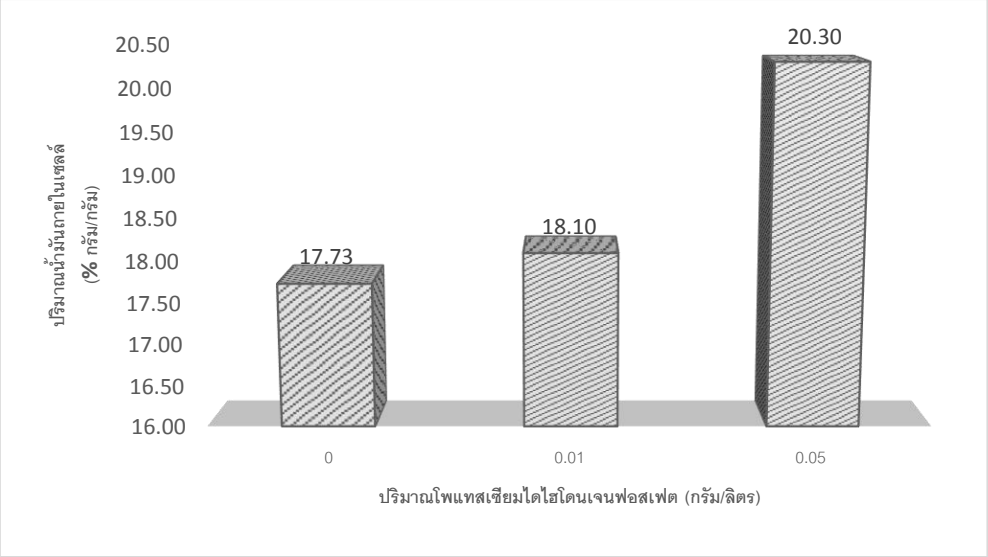
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่มีการเติม KH_2PO_4 พบว่าประกอบด้วย myristic acid (C 14:0) 1.19 %, palmitic acid (C 16:0) 22.03 %, palmitoleic acid (C 16:1) 31.48 %, stearic acid (C 18:0) 0.27 %, oleic acid (C 18:1) 35.71 % และ linoleic acid (C 18:2) 8.62 % ของกรดไขมันทั้งหมด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

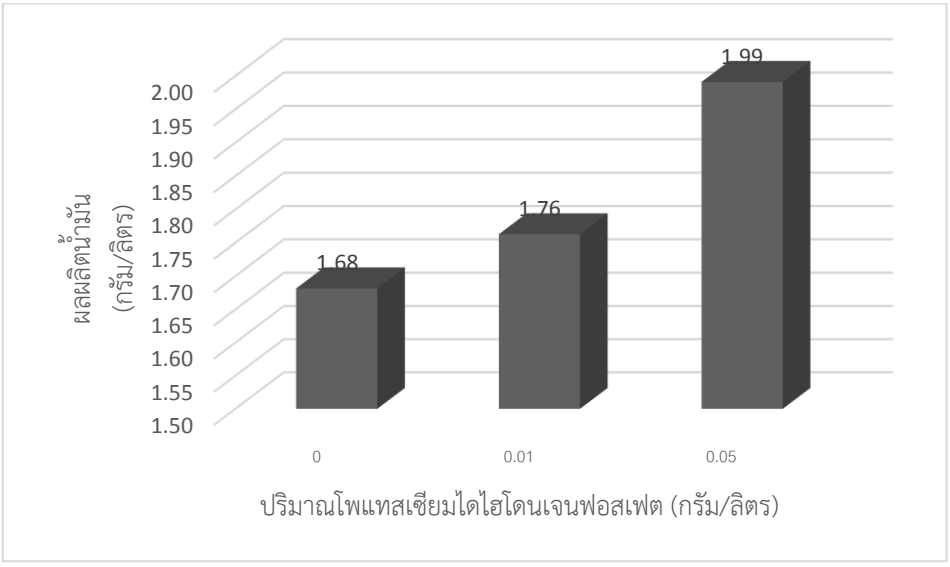
ชนิดของกรดไขมัน	% ของกรดไขมันทั้งหมด
myristic acid (C 14:0)	1.19 ± 0.07
palmitic acid (C 16:0)	22.03 ± 2.77
palmitoleic acid (C 16:1)	31.48 ± 4.54
stearic acid (C 18:0)	0.27 ± 0.05
oleic acid (C 18:1)	35.71 ± 3.07
linoleic acid (C 18:2)	8.62 ± 1.49

4.2.3 ผลการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังเติม KH_2PO_4 ต่างกัน

ผลการแขวนลอยยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติม KH_2PO_4 ปริมาณ 0.01 และ 0.05 กรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน ทำให้แห้งเซลล์แบบเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ และนำไปสกัดน้ำมัน พบว่าเซลล์มีปริมาณน้ำมันภายในเซลล์สูงสุด 20.30 % (กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) (ภาพที่ 11) และในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติม KH_2PO_4 0.05 กรัม/ลิตร ผลผลิตน้ำมันสูงสุด (1.99 กรัม/ลิตร) (ภาพที่ 12) รองลงมาคือในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติม KH_2PO_4 0.01 และ 0 กรัม/ลิตร โดยปริมาณน้ำมันภายในเซลล์เท่ากับ 18.10 และ 17.73 % กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตน้ำมัน 1.76 และ 1.68 กรัม/ลิตร (ตารางที่4) ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (9.79 กรัม/ลิตร) ได้ในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติม KH_2PO_4 0.01 กรัม/ลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเมื่อ KH_2PO_4 ที่เติมมีปริมาณมากขึ้น



ภาพที่ 11 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณฟอสเฟตต่างกัน



ภาพที่12 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่มีฟอสเฟตต่างกัน

ตารางที่ 4 การเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติม KH_2PO_4 ต่างกัน

KH_2PO_4 (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ %(กรัม/กรัม)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)
0	9.4033 ± 1.43	17.7341 ± 2.25	1.6816 ± 0.44
0.01	9.7867 ± 0.57	18.0954 ± 2.50	1.7627 ± 0.17
0.05	9.5807 ± 2.31	20.2957 ± 3.83	1.9910 ± **0.78**

บทที่5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการเปรียบเทียบการผลิตและสะสมน้ำมันในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำ ที่แปรผันการเติม KH_2PO_4 เป็น 0, 0.01 ,0.1 และ 1 กรัม/ลิตร พบว่ายีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ผลิตน้ำมันได้สูงสุด (0.87 กรัม/ลิตร) ในอาหารที่ไม่เติม KH_2PO_4 แสดงว่า อัตราส่วนของคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ในอาหารคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำที่ใช้นี้เหมาะสำหรับการผลิตและสะสมน้ำมันชองยีสต์ชนิดนี้แล้ว (Wang et al., 2018) การเติม KH_2PO_4 0.01, 0.1 และ 1 กรัม/ลิตร ทำให้ผลผลิตน้ำมันลดลง อาจเป็นเพราะยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 นำฟอสฟอรัสที่เติมลงไป ไปใช้เพื่อการเจริญ ส่วนการเพิ่มขึ้นของ KH_2PO_4 ที่เติมจาก 0.01 เป็น 0.1 และ 1 กรัม/ลิตร ทำให้ผลผลิตน้ำมันสูงขึ้น อาจเป็นเพราะในอาหารมีปริมาณไนโตรเจนต่ำ เมื่อยีสต์มีการเจริญถึงระดับหนึ่ง กรัมไนโตรเจนในอาหารไม่เพียงพอสำหรับการเจริญ ในขณะที่ยังคงมีคาร์บอนและ KH_2PO_4 ในอาหาร ยีสต์จึงนำไปใช้ผลิตและสะสมน้ำมัน

ผลการเปรียบเทียบการผลิตและสะสมน้ำมันเมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง ไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน และอาหารผลิตน้ำมันที่เตรียมจากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง และเตรียมจากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน ชนิดสารอาหารที่เติมเช่นเดียวกับอาหารที่มีคาร์บอนสูงและไนโตรเจนต่ำ ยกเว้นไม่เติมกลูโคส พบว่าได้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดในอาหารผลิตน้ำมันที่เตรียมจากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน (1.47 กรัม/ลิตร) ตามด้วยไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง (1.21 กรัม/ลิตร) จึงทำให้ผลผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังมีค่าต่ำกว่าผลผลิตน้ำมันในอาหารผลิตน้ำมันที่เตรียมจากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน แม้ว่าปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์สูงสุดในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง (12.61 % กรัม/กรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง) และในอาหารผลิตน้ำมันที่เตรียมจากไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน (12.32 % กรัม/กรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง) มีค่าใกล้เคียงกัน แต่น้ำหนักเซลล์แห้งในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง (9.6 กรัม/ลิตร) ต่ำกว่าที่ได้ในอาหารผลิตน้ำมันที่เตรียมจากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน (11.76 กรัม/ลิตร) การปรับด่างเกินอาจทำให้ทั้งสารที่ยับยั้งการเจริญและส่งเสริมการเจริญของยีสต์ตกตะกอน ดังนั้นยีสต์จึงเจริญได้ดีในอาหารผลิตน้ำมันที่เตรียมจากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกินแล้วเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญลงไปภายหลัง

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ที่เจริญในไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปหลัง พบว่ามีกรดไขมันปาล์มิโตเลอิก 31.48 % ของกรดไขมันทั้งหมดสูงกว่าปริมาณกรดไขมันปาล์มิโตเลอิกที่พบในน้ำมันเมื่อเจริญยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ (Pranimit, 2017) รายงานว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารต่างกันองค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่ผลิตได้แตกต่างกัน

ผลการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติม KH_2PO_4 0.05 กรัม/ลิตร ได้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด 1.99 กรัม/ลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องจากในไฮโดรไลเสตของ

แป้งมันสำปะหลังมีปริมาณไนโตรเจนอยู่น้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ เมื่อเติม KH_2PO_4 ลงไป 0.05 กรัม/ลิตร ยีสต์จึงนำคาร์บอนและฟอสฟอรัสไปใช้เพื่อการผลิตและสะสมน้ำมัน ทั้งนี้เพราะฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังหุ้มหยดน้ำมันที่ยีสต์สะสมภายในเซลล์ (Qin et al., 2017)

เอกสารอ้างอิง

Axelsson M, Gentili F. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae.PLOS ONE. 2014;24:9(2)

Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, Franzosi, Bianchi D, Compagno C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. Bioresour. Technol. 2012;111:398-403.

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

Landry F CC, Huang Z, Leclair G, Li CS, Oballa R, Zhang L, Bateman K. Plasma-based approach to measure target engagement for liver-targeting stearoyl-CoA desaturase 1 inhibitors. Journal of Lipid Resserch. 2011;52(8):1494-9

Luis A. Garay, Kyria L, Bruce J. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: A Mechanistic Approach and Future Perspectives J Agric Food Chem. 2014;62(13): 2709–2727.

Passos ME, Alves HH, Momesso CM, Faria FG, Murata G, Cury-Boaventura MF, Hatanaka E, Massao-Hirabara S, Gorjão R. Differential effects of palmitoleic acid on human lymphocyte proliferation and function. Lipids Health Dis. 2016;15(1):217.

Pranimit R. Isolation of yeast for oil production from sugarcane leaves hydrolysate. Master's Thesis, Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University ,2017

Qin L, Liu L, Zeng A.P, Wei D. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. Bioresour. Technol. 2017;245:1507-1519

Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Shima J.Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. biotech.2014;153:230-5.

Wang Y ZS, Zhu Z, Shen H, Lin X, Jin X, Jiao X, Zhao ZK. Systems analysis of phosphate-limitation-induced lipid accumulation by the oleaginous *yeast Rhodosporidium toruloides*. Biotechnol Biofuels. 2018;11:148.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast Malt extract medium (YM medium)

glucose 10 กรัม/ลิตร

yeast extract 3 กรัม/ลิตร

malt extract 3 กรัม/ลิตร

peptone 5 กรัม/ลิตร

pH 5.5

Lipid production medium

glucose 50 กรัม/ลิตร

yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร

$(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม/ลิตร

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

pH 5.5

Starch hydrolysate medium

Starch hydrolysate 1 ลิตร

pH 5.5

Starch hydrolysate medium + nutrients

Starch hydrolysate 1 ลิตร

yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร

$(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม/ลิตร

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

pH 5.5

$Ca(OH)_2$ treated starch hydrolysate medium

$Ca(OH)_2$ treated starch hydrolysate 1 ลิตร

pH 5.5

$Ca(OH)_2$ treated starch hydrolysate medium + nutrients

$Ca(OH)_2$ treated starch hydrolysate 1 ลิตร

yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร

$(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม/ลิตร

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

pH 5.5

ภาคผนวก ข.

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง

Composition	(mg/L)
Nitrogen	N.D.
Iron	0.11
Manganese	0.08
Copper	< 0.10
Zinc	0.14
Calcium	7.81
Magnesium	13.2
Potassium	25.0
Total Phosphorus	2.69

* N.D. = non detect.

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่ปรับด่างเกิน

Composition	(mg/L)
Nitrogen	N.D.
Iron	0.17
Manganese	0.12
Copper	< 0.10
Zinc	0.35
Calcium	137
Magnesium	13.6
Potassium	23.8
Total Phosphorus	1.62

* N.D. = non detect.