การผลิตไขมันจากยีสต์โดยใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้ง

นางสาว ชมพูนุท เพชรทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIPID PRODUCTION FROM WASTE SYRUP

Miss Chompoonut Phetthong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไขมันของยีสต์จากน้ำเชื่อมเหลือทิ้ง
โดย	นางสาว ชมพูนุท เพชรทอง
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาตราจารย์ ดร. บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……. ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรี วงศ์ศรี)

……... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล

……. กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรเทพ เขียวหอม)

……. กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันเซ็ง สิทธิกิจโยธิน)

ชมพูนุท เพชรทอง : การผลิตไขมันจากยีสต์โดยใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้ง . (LIPID PRODUCTION FROM WASTE SYRUP) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ. ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล.126 หน้า.

การศึกษาการผลิตไขมันจากน้ำเชื่อมเหลือทิ้งของกระบวนการเชื่อมผลไม้ด้วยสายพันธุ์ยีสต์ คือ *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides* และ *Rhodotorula graminis* ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตไขมัน เมื่อทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยปราศจากการเติมสารอาหาร พบว่า เชื้อยีสต์ *R. glutinis* มีความสามารถสูงที่สุดในการใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นวัตถุดิบ โดยทำการศึกษาถึงอิทธิผลของค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไนโตรเจน ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส ต่อการผลิตไขมันของ *R. glutinis* ผลได้การผลิตมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทำการปรับองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการผลิตให้เหมาะสม การผลิตไขมันสูงสุดได้จากถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 120 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นแอมโมเนียมฟอสเฟต 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้น โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 17.390 กรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ (Yp/s) มีค่าเท่ากับ 17.39 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตไขมันจำเพาะสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.046 ต่อชั่วโมงและ 0.013 กรัมต่อกรัม -ชั่วโมง เมื่อทำการศึกษาองค์ประกอบของไขมันที่มีกรดไขมัน 8- 24 คาร์บอนอะตอม พบว่า กรดไขมันส่วนใหญ่ คือ กรดโอเลอิค กรดปาลมิติกและกรดลิโนเลอิค ซึ่งจัดเป็นส่วน 80 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด

ภาควิชา...วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา...วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ปีการศึกษา ..2553……

5270846721 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : Waste syrup / Yeast / Oleaginous / Lipid / Fatty acids

CHOMPOONUT PHETTHONG: LIPID PRODUCTION FROM WASTE SYRUP.

ADVISOR: CHUTIMON SATIRAPIPATHKUL, Ph.D., 126 pp.

Lipid production from waste syrup of sweetening fruit processing by yeast strains, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, and *Rhodotorula graminis* was studied. In order to evaluate the lipid production efficiency, media containing different initial reducing sugar concentration without nutrient supplements addition were studied. *R. glutinis* exhibited the highest potential to used waste syrup as substrate. The influence of pH, temperature, nitrogen concentration and phosphorus concentration on lipid production of *R. glutinis* were investigated. Higher yield was obtained after optimizing media components and production conditions. Maximum lipid production was obtained in a 3 L reactor at pH 4.0, 28 °C , 120 h of cultivation with 100 g of reducing sugar /L , 40 g of ammonium sulfate / L and 10 g of potassium dihydrogen phosphate /L. The maximum lipid production of 17.872 g / L was obtained and percentage of conversion (Yp/s) was 17.39. The maximal specific growth rate and specific rate of lipid production were 0.046 hr^{-1} and 0.013 g /g-hr. Lipid composition of fatty acids with 8–24 carbon atoms was studied. The major fatty acids were oleic, palmitic and linoleic acids, which formed 80% of the total number of fatty acids.

Department : Chemical Engineering Student's Signature .....

Field of Study : Chemical Engineering Advisor's Signature .....

Academic Year : 2010 .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ทุนส่งเสริมการวิจัย คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2553 ที่ให้การสนับสนุนทางด้านทุนการทำวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อ.ดร.ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางการวิจัย และให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขและเพิ่มเติมวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตั้งแต่ต้นจนสำเร็จเป็นรูปเล่ม

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มนตรี วงศ์ศรี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรเทพ เขียวหอม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันเซ็ง สิทธิกิจโยธิน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิศวกรรมเคมี และเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน พี่และน้องๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว และท่านผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ได้ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 2

1.3 ขอบเขตการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 จุลินทรีย์ไขมันสูง..... 4

2.1.1 สาหร่าย..... 6

2.1.2 รา..... 6

2.1.3 แบคทีเรีย..... 7

2.1.4 ยีสต์..... 8

2.2 ประวัติการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์..... 9

2.3 การสังเคราะห์ลิปิดในยีสต์..... 13

2.3.1 การสังเคราะห์ กรดปาล์มมิติกจาก Acetyl-CoA..... 14

2.3.1.1 การเตรียมสารตัวกลางสำหรับการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติก..... 14

2.3.1.2 ขั้นตอนการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติก..... 15

2.3.2 การเพิ่มความยาวของกรดไขมัน (Elongation of Fatty acid chains)..... 17

2.3.3 การเติมพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมัน (Fatty acid desaturation)..... 17

2.4 ข้อดีของการใช้ยีสต์เป็นแหล่งไขมัน..... 20

2.5 องค์ประกอบของลิปิดที่ได้จากยีสต์..... 20

บทที่ หน้า

2.6 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตลิปิดในยีสต์..... 22
2.6.1 แหล่งคาร์บอน..... 22
2.6.2 แหล่งไนโตรเจน..... 23
2.6.3 แหล่งฟอสฟอรัส..... 24
2.6.4 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน..... 24
2.6.5 ปริมาณออกซิเจน..... 26
2.6.6 อุณหภูมิ..... 26
2.6.7 ความเป็นกรด-เบส..... 27
2.7 น้ำเชื่อมเหลือทิ้งจากโรงงานมะยมดอง..... 28
3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 31
3.1 อุปกรณ์..... 31
3.2 เคมีภัณฑ์..... 31
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาการผลิตไขมัน..... 32
3.4 การออกแบบการทดลอง..... .. 33
3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ..... 33
3.4.2 การเติมหัวเชื้อและการหมัก..... 33
3.4.3 การเก็บตัวอย่าง..... 33
3.4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันได้มากที่สุด
เมื่อเลี้ยงด้วยน้ำเชื่อมเหลือทิ้ง..... 34
3.4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของเชื้อที่คัดเลือกได้..... 34
3.4.5.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการผลิตไขมัน..... 34
3.4.5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไขมัน..... 34
3.4.5.3 การศึกษาความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตไขมัน.. 35
3.4.5.4 การศึกษาความเข้มข้นฟอสเฟตที่เหมาะสมในการผลิตไขมัน.... 35
3.4.6 ศึกษาการผลิตไขมันของเชื้อและสภาวะที่คัดเลือกได้โดยใช้กระบวน
การหมักแบบกะในถังหมักขนาด 3 ลิตร..... 35
4 ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง..... 36
4.1ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเชื่อมเหลือทิ้ง..... 36

บทที่ หน้า

4.2 ผลการศึกษาผลของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ต่อการผลิตไขมัน..... 36
4.2.1 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R.glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50, 100 และ 200 กรัมต่อลิตร..... 36
4.2.2 ผลการเลี้ยงเชื้อ *Rs.toruloides* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50, 100 และ 200 กรัมต่อลิตร..... 42
4.2.3 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R.graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50, 100 และ 200 กรัมต่อลิตร..... 47
4.3 ผลการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเบสต่อการผลิตไขมัน..... 55
4.4 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไขมัน..... 61
4.5 ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตไขมัน..... 67
4.6 ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการผลิตไขมัน..... 73
4.7 ผลการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *R.glutinis* ด้วยสภาวะที่ทดลองได้ในถังปฏิกรณ์..... 78
4.8 องค์ประกอบของไขมันที่ได้..... 83
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 87
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 87
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 90
รายการอ้างอิง..... 91
ภาคผนวก..... 98
ภาคผนวก ก สูตรสารอาหารในการหมัก..... 99
ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง..... 100
ภาคผนวก ค การคำนวณ..... 103
ภาคผนวก ง ข้อมูลทางการทดลองและกราฟมาตรฐาน..... 105
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 126

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตไขมันจากยีสต์	1
2.1	ตัวอย่างจุลินทรีย์ไขมันสูง	5
2.2	ตัวอย่างยีสต์ไขมันสูง	9
2.3	ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งที่มีการผลิตจากจุลินทรีย์	12
2.4	ตัวอย่างวิจัยที่มีการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์เพื่อเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการไบโอดีเซล	12
2.5	ตัวอย่างกรดไขมันในยีสต์ไขมันสูง	21
2.6	ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งในการผลิตไขมัน	29
4.1	องค์ประกอบของน้ำเชื่อมผลไม้เหลือทิ้ง	36
4.2	ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส โดยการแปรผันค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์	41
4.3	ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อการเลี้ยงเชื้อ *Rs.toruloides* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส โดยการแปรผันค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์	46
4.4	ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อการเลี้ยงเชื้อเชื้อ *R. graminis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส โดยการแปรผันค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์	51
4.5	ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส	52
4.6	ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบส	57
4.7	ผลของค่าความเป็นกรดเบสต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องโดยการแปรผันค่าความเป็นกรดเบส	60
4.8	ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 โดยแปรผันค่าอุณหภูมิ	62

ตารางที่ หน้า

4.9 ผลของอุณหภูมิต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 โดยการแปรผันอุณหภูมิ..... 66

4.10 ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยแปรผันค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตเจน..... 68

4.11 ผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยแปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต..... 72

4.12 ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต..... 74

4.13 ผลของความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต..... 77

4.14 ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร..... 78

4.15 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ28องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร..... 82

4.16 องค์ประกอบของไขมันที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ..... 84

4.17 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของไขมันที่ได้จากแหล่งต่างๆ..... 85

ตารางที่		หน้า
5.1	การเปรียบเทียบความสามารถในการ ผลิตไขมัน ของเชื้อ *R.Glutinis* เมื่อใช้วัตถุดิบต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	89
ข1.1	การเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0-250 กรัมต่อลิตร.....	101
ง1.1	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis, Rs. toruloides* และ *R.graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร.....	105
ง1.2	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis, Rs. toruloides* และ *R.graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร.....	106
ง1.3	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis, Rs. toruloides* และ *R.graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 200 กรัมต่อลิตร.....	107
ง1.4	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและที่ค่าความเป็นกรดเบส 3.0.....	108
ง1.5	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0.....	109
ง1.6	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและที่ค่าความเป็นกรดเบส 5.0.....	110
ง1.7	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและที่ค่าความเป็นกรดเบส 6.0.....	111
ง1.8	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0.....	112
ง1.9	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0.....	113
ง1.10	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0.....	114
ง1.11	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0.....	
ง1.12	ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร.....	115 116

ตารางที่ หน้า

ง1.13 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 20 กรัมต่อลิตร..... 117

ง1.14 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 30 กรัมต่อลิตร..... 118

ง1.15 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร..... 119

ง1.16 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโจรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร..... 120

ง1.17 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโจรเจนฟอสเฟต 20 กรัมต่อลิตร..... 121

ง1.18 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 แอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และโปตัสเซียมไดไฮโจรเจนฟอสเฟต 30 กรัมต่อลิตร..... 122

ง1.19 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 แอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และโปตัสเซียมไดไฮโจรเจนฟอสเฟต 40 กรัมต่อลิตร..... 123

ง 1.20 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 แอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และโปตัสเซียมไดไฮโจรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร..... 124

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การนำ Acetyl-CoA ออกจากไมโทคอนเดรียโดยใช้ Citrate เป็นตัวพา.....	13
2.2	การสังเคราะห์ Malonyl-CoA, Malonyl-ACP และ Acetyl-ACP.....	15
2.3	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติก.....	16
2.4	การเพิ่มความยาวของกรดไขมันใน endoplasmic reticulum.....	17
2.5	การสังเคราห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว.....	18
2.6	ระบบการทำให้เกิดพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมัน (Fatty acid desaturation system).....	19
2.7	โรงงานและลักษณะมะยมที่ได้จากการเชื่อม.....	30
3.1	เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง.....	32
4.1	ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆผลการหมักเชื้อ *Rs.toruloides* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น.....	39
4.2	การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ.....	40
4.3	ผลการเลี้ยงเชื้อ *Rs.toruloides* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆปริมาณไขมันที่ได้จากการหมักเชื้อ *R. glutinis, R. toruloides* และ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50, 100 และ 200 กรัมต่อลิตร.....	43
4.4	การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมัก โดยเชื้อ *Rs.toruloides* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ.....	45
4.5	ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ.....	48
4.6	การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ.....	50
4.7	ปริมาณไขมันที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis, R. toruloides* และ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50- 200 กรัมต่อลิตร.....	54
4.8	ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตรที่ความเป็นกรดเบสต่างๆ.....	58
4.9	การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหาร 3.0- 6.0	60
4.10	ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และที่อุณหภูมิค่าต่างๆ.....	64

ภาพที่ หน้า

4.11 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และที่อุณหภูมิ 20- 40 องศาเซลเซียส..... 65

4.12 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆ..... 70

4.13 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R.graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตในแหล่งอาหารเท่ากับ 10-40 กรัมต่อลิตร..... 71

4.14 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่างๆ..... 75

4.15 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต10 - 40 กรัมต่อลิตร..... 76

4.16 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร..... 80

4.17 การเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร และสภาวะแวดล้อมที่คัดเลือกได้..... 81

4.18 ไขมันที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต10 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร..... 86

ง.2 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง..... 125

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมแปรรูปผักและผลไม้ในประเทศไทยเป็นอุตสาหกรรมที่ผลิตเพื่อการส่งออกเป็นส่วนใหญ่โดยในปี พ.ศ. 2545 มีมูลค่าการส่งออกถึง 37,470.3 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 8.84 ของมูลค่าการส่งออกอุตสาหกรรมอาหารทั้งหมด ซึ่งจากข้อมูลของกรมโรงงานอุตสาหกรรมและกรมส่งเสริมอุตสาหกรรม (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม , 2540) ในปีพ.ศ. 2539 มีโรงงานแปรรูปผักและผลไม้บรรจุกระป๋องรวม 118 โรงงาน กระจายอยู่ตามภูมิภาคต่างๆทั่วประเทศ จะเห็นได้ว่าปริมาณการผลิตของอุตสาหกรรมแปรรูปผักและผลไม้ในประเทศไทยในแต่ละปีนั้นมีปริมาณมาก ฉะนั้นจึงทำให้มีน้ำเชื่อมซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการปรุงแต่งรสที่ใช้ซ้ำๆกัน และเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต ถูกปล่อยทิ้งสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจำนวนมาก ทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ เนื่องจากน้ำเชื่อมเข้มข้นเหล่านี้มีน้ำตาลกลูโคสและซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก (Nigam และ J.N., 1999) มีกรดอินทรีย์ปะปน ทำให้ค่าความเป็นกรดเบสต่ำโดยจะอยู่ที่ประมาณ 3.4-4.34 ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องได้รับการบำบัดก่อนจะปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม แต่เนื่องจากน้ำเชื่อมที่ใช้นี้มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลที่ค่อนข้างสูง จึงทำให้น้ำเชื่อมมีความหนืดสูง ส่งผลให้ทำให้กระบวนการบำบัดน้ำเสียที่นิยมใช้กันทั่วไป (Chanda และ Chakrabatri, 1996) คือ Activated Sludge , Oxidation Pound และ Tricking Filter นั้นมีประสิทธิภาพการทำงานของระบบต่ำประกอบกับผู้ประกอบการในประเทศไทยที่มีมีโรงงานขนาดเล็ก และกำลังการผลิตต่ำ หรือผลิตในระดับครัวเรือนนั้น การใช้ระบบบำบัดน้ำเสียที่กล่าวข้างต้นนั้นจะเป็นการลงทุนที่ใช้ต้นทุนสูงกว่าเมื่อเทียบกับรายได้จากการผลิต ทำให้ผู้ประกอบการส่วนใหญ่มักกำจัดน้ำเสียโดยการระบายทิ้งลงสู่แหล่งน้ำโดยตรงมากกว่า จึงก่อให้เกิดปัญหาการเน่าเสียของแหล่งน้ำ แม้จะมีการนำน้ำเชื่อมเหลือทิ้งบางส่วนไปใช้ประโยชน์ในการทำปุ๋ยบ้างแล้วแต่ปริมาณน้ำเชื่อมเหลือทิ้งที่มีนั้นก็ยังมีปริมาณมากเกินต้องการ

สำหรับแนวทางเลือกอีกทางที่น่าสนใจ คือ การนำน้ำเชื่อมเข้มข้นเหล่านี้มาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นแหล่งอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ คือ เชื้อยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อแรงออสโมซิสสูงๆได้ และเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลและกรดอินทรีย์ อีกทั้งยีสต์ยังสามารถสังเคราะห์สารต่างๆ ภายในตัวเซลล์ เช่น โปรตีน วิตามิน และรงควัตถุสีต่างๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไขมันซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยาและใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางค์หลายประเภท เช่น โลชั่น ครีมบำรุงผิว และลิปสติก (Daum ,G. และคณะ, 1998) เพื่อให้เกิดการให้ความชุ่มชื้นกับผิวหนัง ทั้งยังมีฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่มีประสิทธิภาพสูงในการช่วยปกป้องผิวจากการทำลายของแสงอาทิตย์ได้ นอกจากนั้นในทางโภชนาการได้มีการนำไขมันเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆเช่น โรคหัวใจ โรคข้ออักเสบ และลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด เป็นต้น (Smith และ T.J., 2000) ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไขมันของยีสต์แสดงดังตารางที่ 1.1 การสกัดไขมันจากยีสต์ จะมีข้อดีกว่าการผลิตจากสัตว์ทะเลน้ำลึก (Springer และคณะ, 1989) ที่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ทำให้ต้นทุนที่ใช้ในการผลิตสูงมาก (He และ คณะ, 2002) ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะนำยีสต์มาเป็นแหล่งผลิตอีกแหล่งหนึ่ง เพราะยีสต์เจริญเติบโตได้รวดเร็วและมีเซลล์ขนาดใหญ่ทำให้ง่ายต่อการสกัด นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้ปริมาณมากโดยใช้พื้นที่ไม่มาก และยังสามารถเพิ่มปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไขมันได้อีกด้วย

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตไขมันจากยีสต์

ผลิตภัณฑ์	ราคา (ดอลลาร์สหรัฐ)	การนำไปใช้ประโยชน์
Caprylic acid	1.61	เป็นสารตัวกลางในการผลิตสารประกอบเอสเทอร์เพื่อนำไปใช้ผลิตน้ำหอม
Capric acid	1.32	ใช้ในการผลิตน้ำหอม
Lauric acid	1.43	ใช้ในการผลิตสบู่
Myristic acid	2.86	ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดลอริคและใช้ในการทำแชมพู ครีม และเครื่องสำอางค์
Oleic acid	1.01	สบู่เหลว, ฆ่าเชื้อโรค, สารหล่อลื่น, กระดาษคาร์บอน
Palmitic acid	1.17	สี, น้ำยาเคลือบสี, แล็คเกอร์

(ที่มา Turcotte และ N.Kosaric, 1989)

1.2 วัตถุประสงค์

1.คัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันจากการใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งวัตถุดิบ

2.เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากการใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งวัตถุดิบ

3.เพื่อศึกษาการผลิตไขมันของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันได้มากที่สุดจากยีสต์ 3 สายพันธุ์โดยใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งจากโรงงานผลไม้ดอง พี ซี ฟรุ๊ท ประเทศไทย จำกัด เป็นแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่าและทำการเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของน้ำเชื่อมเหลือทิ้ง

2.หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิปิดจากน้ำเชื่อมเหลือทิ้งจากยีสต์ที่คัดเลือกได้โดยศึกษาตัวแปรดังต่อไปนี้

-ความเข้มข้นของน้ำเชื่อมเหลือทิ้ง

-ค่าความเป็นกรดเบส

-อุณหภูมิ

-ความเข้มข้นของไนโตรเจน

-ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส

3.ทำการทดลองในระดับถังปฏิกรณ์ ขนาด 3 ลิตร ในห้องปฏิบัติการ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการเพิ่มผลผลิตไขมันจากยีสต์ในระดับห้องปฏิบัติการและเป็นแนวทางสำหรับการผลิตในระดับขยายส่วนต่อไป

2.ได้แหล่งไขมันจากจุลินทรีย์ ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนไขมันที่ได้จากแหล่งอื่นๆได้

3.ส่งเสริมแนวทางการใช้ประโยชน์จากน้ำเชื่อมเหลือทิ้งของโรงงานให้แก่ผู้ประกอบการและผู้ที่สนใจ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 **จุลินทรีย์ไขมันสูง** (oleaginous microorganisms)

จุลินทรีย์ที่มีการสะสมไขมัน ภายในเซลล์นั้นมีทั้ง ยีสต์ รา และแบคทีเรีย โดยแต่ละชนิดจะมีไขมันเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่สำคัญในเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ นิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย และเอนโดพลาสมิคเรติคูลัม และชนิดของกรดไขมันในไขมันนั้นจะแตกต่างกันไปตามสภาวะและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยส่วนใหญ่แล้วจุลินทรีย์ทั่วไปจะมีน้ำมันและไขมันอยู่น้อยกว่าร้อยละ 5-10 ของน้ำหนักแห้ง (Ratledge, 1981; Ratledge, 2001; Papanikolaou et al., 2001) ซึ่งจะเรียกจุลินทรีย์จำพวกนี้ว่าจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง (non-oleaginous microorganisms) สำหรับจุลินทรีย์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักแห้งจะเรียกว่าจุลินทรีย์ไขมันสูง (Oleaginous microorganisms) (Ratledge และ Evans, 1989) ซึ่งจากจุลินทรีย์ 60,000 สปีชีส์จะมีจุลินทรีย์เพียง 50 สปีชีส์เท่านั้นที่มีการสะสมไขมันภายในตัวเซลล์ได้สูงกว่าร้อยละ 25 ของน้ำหนักแห้ง สำหรับยีสต์จะพบเพียง 25 สปีชีส์จาก 600 สปีชีส์เท่านั้นที่เป็นยีสต์ไขมันสูง จุลินทรีย์ไขมันสูงบางชนิดสามารถสะสมน้ำมันและไขมันภายในตัวเซลล์ได้สูงถึงร้อยละ 70 ของน้ำหนักแห้ง ตัวอย่างจุลินทรีย์ไขมันสูงแสดงไว้ดังตารางที่ 2.1 นอกจากนี้จากการศึกษาของ Boulton และ Ratledge (1981) นั้นพบว่าจุลินทรีย์ไขมันสูงนั้นจะมีเอนไซม์ ATP : Citrate lyase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไขมันของจุลินทรีย์ โดยจะไม่พบเอมไซน์ชนิดนี้ในจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ไขมันสูง

จุลินทรีย์	**สายพันธุ์**	**ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)**
สาหร่าย	*Botryococcus braunii*	25-75
	Cylindrotheca sp.	16-37
	Nitzschia sp.	45-47
	Schizochytrium sp.	50-77
รา	*Aspergillus oryzae*	57
	Mortierella isabellina	86
	Humicola lanuginose	75
	Mortierella vinacea	66
แบคทีเรีย	*Arthrobacter sp.*	> 40
	Acinetobacter calcoaceticus	27-38
	Rhodococcus opacus	24-25
	Bacillus alcalophilus	18-24
ยีสต์	*Candida curvata*	58
	Crytococcus albidus	65
	Lipomyces starkeyi	64
	Rhodotorula glutinis	72

(ที่มา Meng และคณะ, 2009)

2.1.1 สาหร่าย

สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์อีกชนิดที่มีการสะสมไขมันภายในเซลล์สูง โดยสาหร่ายบางชนิดสามารถสะสมไขมันภายในเซลล์ได้สูงถึงร้อยละ 85 ของน้ำหนักแห้ง ปัจจุบันมีการนำสาหร่ายสายพันธุ์ต่างๆ อาทิ *Nitzchia sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Navicula sp.*, *Phaeodactylum sp.* และ *Porphyridium sp.* มาใช้ในการผลิตอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid, EPA) โดยอาศัยเทคโนโลยีการหมัก แต่ปัญหาที่พบคืออีพีเอที่ได้จากการผลิตโดยใช้สาหร่ายจะไม่อยู่ในรูปของไตรกรีเซอไรด์ จึงไม่เหมาะแก่การนำไปใช้ และปริมาณสาหร่ายที่ได้จาการเพาะเลี้ยงจะมีปริมาณไม่สูงเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการนำไขมันที่ได้จากสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ในด้านอาหารและสุขภาพ เช่น การนำสาหร่าย *Porphyridium sp.*มาใช้เป็น hyperlipidemia เพื่อใช้ลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือดเนื่องจากสามารถสังเคราะห์ Arachidonic acid (C20:4), Linoleic acid (C18:2), Linolenic acid (C18:3) และ Elcosapentaenoic acid (C20:5) ได้ แต่การนำไขมันจากสาหร่ายไปใช้ประโยชน์นั้นยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของการสกัดแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ ทั้ง นี้เนื่องจากสาหร่ายมีคลอโรฟิลล์อยู่เป็นจำนวนมาก การจะแยกคลอโรฟิลล์ออกจึงเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งสาหร่ายนั้นมีระยะเวลาการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าการเจริญเติบโตของยีสต์ ดังนั้นในการหมักหนึ่งกะจึงใช้เวลานานกว่า นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของสถานที่ในการเลี้ยง เนื่องจากสาหร่ายต้องใช้แสงแดดในการเจริญเติบโตและต้องใช้พื้นที่ในการเลี้ยงมาก อย่างไรก็ตามมีการนำไขมันจากสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ในด้านของน้ำมันเชื้อเพลิงแต่พบว่ายังไม่เหมาะสมเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่มีในไขมันจากสาหร่ายนั้นเป็นปัญหาต่อเครื่องยนต์

2.1.2 รา

การผลิตไขมันจากราส่วนใหญ่แล้วนิยมนำไปใช้ในการผลิตกรดไขมันที่มีราคาสูง เช่นเดียวกับแบคทีเรีย เช่นมีการผลิตกรดแกรมมาลิกโนลีนิก (Gamma-Linolenic Acid GLA) จากรา เนื่องจากไขมันที่ได้จากรานั้นมีปริมาณกรดแกรมมาลิกโนลีนิกสูงถึงร้อยละ 15-25 ของปริมาณไขมันทั้งหมด

Lindberg และคณะ (1993) ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ในรา *Mortierella alpine* CBS 343.66 พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อชนิดของกรดไขมันที่สังเคราะห์ได้ โดยที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสจะมีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งมากกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สมพิศ จิตต์ซื่อ (2006) ทำการศึกษาผลของสภาวะกดดันจากเอธานอลต่อการเจริญเติบโต การผลิตกรดไขมันทั้งหมด และกรดแกมมาลิโนเลนิกในรา *Mucor rouxii* ATCC 24905 โดยเติมเอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในระยะต่างๆ ของการ

เติบโตพบว่าการเติมเอธานอลจะมีผลทำให้การผลิตกรดไขมันและการเจริญเติบโตของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่เติมและความเข้มข้นของเอธานอลที่เติม พบว่าการเติมเอธานอลความเข้มข้นต่ำ คือร้อยละ 1 และ 2 ของอาหาร ลงไปในเซลล์ระยะ late logarithmic phase ทำให้ราสามารถผลิตชีวมวลได้เพิ่มขึ้น โดยได้น้ำหนักแห้งสูงสุด ใกล้เคียงกัน คือประมาณ 9.0 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดและกรดแกมมาลิโนลีนิกในน้ำหนักแห้งสูงสุดคือร้อยละ 17.2 และ 2.3 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ

2.1.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่สามารถผลิตไขมันได้เช่นกัน ซึ่งเวลาที่ใช้ในการผลิตนั้นค่อนข้างสั้นเนื่องจากแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและพื้นที่ๆใช้ในการเลี้ยงนั้นไม่มาก แต่ปริมาณไขมันที่แบคทีเรียสามารถผลิตได้นั้นยังต่ำเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นและองค์ประกอบของไขมันหรือกรดไขมันชนิดต่างๆนั้นซับซ้อนทำให้ยุ่งยากต่อการสกัด อีกทั้งแบคทีเรียบางชนิดนั้นมีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดโรคและเกิดสารพิษปนเปื้อนในลิปิดที่ได้ จึงไม่เป็นที่นิยม (Hammond และ Glatx, 1988)

งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไขมันหรือกรดไขมันจากแบคทีเรียนั้นส่วนใหญ่จะสนใจผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) ซึ่งมีราคาสูงเนื่องจากปริมาณไขมันที่แบคทีเรียผลิตได้นั้นค่อนข้างต่ำจึงต้องเลือกผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูงเพื่อคุ้มค่ากับการลงทุน

Yazawa และคณะ (1988) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตกรดไขมันของแบคทีเรีย โดยทำการแยกแบคทีเรียได้แบคทีเรียแกรมลบที่ให้รหัส SCRC-8132 ซึ่งมีความสามารถผลิตอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid, EPA) ได้ถึง 15 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและจะสามารถผลิตเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 40 ของไขมันทั้งหมดหากทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Yano และคณะ (1994) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตสาร คือ ดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, DHA) จากปลาทะเลน้ำลึกได้ โดยจะผลิตดีเอชเอได้ร้อยละ 6.4-11.6 ของกรดไขมันทั้งหมดหรือประมาณ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

อย่างไรก็ตามการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งจากแบคทีเรียนั้นยังเป็นการทดลองที่อยู่ในระดับห้องปฏิบัติการอยู่ เนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียนั้นมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งต่ำมาก แม้จะมีรายงานว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียจากทะเลบางชนิดมีปริมาณกรดไขมันสูงถึงร้อยละ 25 ก็ตามแต่ก็ไม่เป็นที่น่าสนใจในแง่ของการผลิตทางการค้าเท่าใดนัก ที่เป็นเช่นนี้เพราะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวต้องการสภาพที่จำเพาะสูงมาก

2.1.4 ยีสต์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวเช่นเดียวกับราและสาหร่าย มีรูปลักษณะกลม หรือ ทรงรี พบได้ในแหล่งธรรมชาติต่างๆเช่น ดิน เมล็ดผลไม้ เปลือกไม้ ลำไส้ของมนุษย์ เป็นต้น ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่จัดได้ว่ามีประสิทธิภาพสูงในการสะสมไขมันภายในเซลล์ เนื่องจากยีสต์เจริญเติบโตเร็ว จึงใช้เวลาสั้นในการเลี้ยง พื้นที่ในการเลี้ยงไม่ต้องใช้พื้นที่มากและไขมันที่ได้ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษ รวมถึงสามารถสกัดไขมันออกจากเซลล์ได้ง่ายกว่าแบคทีเรียและสาหร่าย (Laning, 1991) อีกทั้งยีสต์ยังสามารถใช้ซับสเตรตที่มีราคาถูก ใช้ได้ทั้งแหล่งคาร์บอนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic Carbon Source) และแหล่งคาร์บอนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Carbon Source) เช่น น้ำมันดิบ น้ำมันพืช เอสเทอร์ของกรดไขมัน น้ำมันดิบ สบู่ และไฮโดร คาร์บอน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2006)

Ratledge และ James (2002) รายงานถึงสาเหตุที่ยีสต์ไขมันสูงสามารถผลิตไขมันได้มากกว่ายีสต์ที่ไม่ใช่ยีสต์ไขมันสูง โดยพบว่า

1.ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนในอาหาร ยีสต์ที่ไม่ใช่ยีสต์ไขมันสูงจะหยุดการแอสซิมิเลตกลูโคส ดังนั้นจึงไม่มีการเกิดขึ้นของหน่วยอะซิเตรท ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์ไขมัน

2.เอนไซม์แอซีทิลโคเอคาร์บอกซิเลส (Acetyl CoA Carboxylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเริ่มต้นของการสังเราะห์ไขมัน เกิดปฏิกิริยาได้เป็นอย่างดีในยีสต์ไขมันสูงแต่ในยีสต์ที่ไม่ใช่ยีสต์ไขมันสูง พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้อาจถูกระงับหรือไม่มีการนำกลับมาใช้ในการเป็นสารตั้งต้นเพื่อทำปฏิกิริยาในการผลิตสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไขมันต่อไป โดยคาดว่าเป็นการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์จากกระบวนการสังเคราะห์ไขมันในครั้งแรก

3.ในยีสต์ที่ไม่ใช่ยีสต์ไขมันสูงจะมีวัฏจักรการสังเคราะห์ไขมันเพียงเล็กน้อย โดยจะเกิดขึ้นพร้อมกับการนำไขมันที่ได้นั้นไปใช้ ทำให้ไม่มีการสะสมไขมันภายในเซลล์เกิดขึ้น

ในปัจจุบันมีการนำยีสต์ไปใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันที่สามารถรับประทานได้เรียกว่า น้ำมันเซลล์เดี่ยว (Single Cell Oil) โดยเป็นการผลิตเพื่อการค้าใช้ขนาดถังหมัก 220 ลูกบาศก์เมตร (Ratledge, 2001) นอกจากนี้ยังมีการนำยีสต์ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์แทนการใช้ไขจากสัตว์ พบว่า ประสิทธิภาพในการกินอาหาร (Feed Efficiency) ของไก่เพิ่มขึ้น 6 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อไก่ที่ได้จากการใช้อาหารที่เติมยีสต์ไขมันสูงนั้น พบว่าจะมีสัดส่วนของกรดโอลีอิกในเนื้ออกและต้นขาต่ำกว่าที่ใช้อาหารทั่วไป เนื่องจากยีสต์สามารถเจริญ เติบโตได้ในซับสเตรตหลายชนิดในปัจจุบันจึงมีการลดต้นทุนการผลิตไขมันจากยีสต์ โดยใช้ซับสเตรตที่เหลือทิ้งจากกระบวนการอื่นๆ เช่น Xue และคณะ (2007) ได้มีการนำน้ำเสียเหลือทิ้งจากโรงงานผงชูรสมาเป็นซับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis* โดยมีการเติมกลูโคสเพิ่มลงไปในอาหารเลี้ยง

เชื้อพบว่านอกจากจะทำให้ได้ปริมาณไขมันร้อยละ 20 ของน้ำหนักแห้งแล้วยังส่งผลให้ค่าซีโอดีลดลงถึงร้อยละ 45

จะเห็นได้ว่าการผลิตไขมันจากยีสต์นั้นยังเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากยีสต์ใช้ซับสเตรตได้หลายชนิดและองค์ประกอบของไขมันที่ได้มีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับซับสเตรตที่ใช้ สายพันธุ์ของยีสต์ และสภาวะที่ใช้ในการเจริญเติบโตตัวอย่างยีสต์ไขมันสูงแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงตัวอย่างยีสต์ไขมันสูง

สายพันธุ์	**ปริมาณไขมันสูงสุด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)**
Candida sp. 107	45
Candida curvatan D	58
Candida curvatan R	51
Candida didensiae	37
Crytococcus (*tericolus*) *albidus var. albidus*	65
Endomycopsis vernalis	65
Hansenula sarturnus	28
Lipomyces lipofer	64
Lipomyces starkeyi	63
Lipomyces tetrasporus	67
Rhodosporidium toruloides	51
Rhodotorula glutinis (gracilis)	72
Rhodotorula graminis	41
Rhotorula mucilaginosa	28
Trichosporon ceutanium	45
Trichosporon pullulans	33
Trigonopsis variablis	40
Yarrowia (Candida, Saccharomycopsis)	36

(ที่มา Ratledge และ Tan,1990)

2.2 ประวัติการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์

การศึกษาการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์นั้นมีมาอย่างยาวนานตั่งแต่ประมาณ ปี 1870 (Ficinus, 1873 ; Nageli and Loew, 1878 ; Ratledge 1984, 1992) โดยการริเริ่มที่จะนำน้ำมัน

จากจุลินทรีย์มาใช้เป็นโภคภัณฑ์หรือสินค้าที่ใช้อย่างทั่วไปนั้นเริ่มต้นขึ้นอย่างจริงจังเมื่อศตวรรษที่ผ่านมา ในประเทศเยอรมันนีระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 Paul Lindner ใช้ยีสต์ไขมันสูงซึ่งในปัจจุบันระบุว่าเป็นสายพันธุ์ *Metschnikowia pulcherrima* ในการผลิตน้ำมันเพื่อใช้ในการบริโภค เนื่องจากประเทศเยอรมันนีถูกระงับการนำเข้าน้ำมันจากประเทศผู้ผลิต หลังจากนั้นความก้าวหน้าในการพัฒนากระบวนการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์พบอย่างแพร่หลายในประเทศเยอรมันจาก ค.ศ.1920-1945 (Bernhaver, 1943 ; Bernhaver และ Rauch , 1948 ; Hesse , 1949)

ความสนใจในการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์ในเชิงอุตสาหกรรมจากประเทศอื่น เช่น อเมริกาและอังกฤษ มีสูงขึ้นในปลาย ค.ศ. 1950 และทำให้มีการริเริ่มผลิตไขมันจากแหล่งวัตถุดิบจากธรรมชาติอื่น ๆ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิต ซึ่งพบว่าไขมันจากจุลินทรีย์นั้นมีต้นทุนและราคาในการผลิตที่สูงกว่าวัตถุดิบจากธรรมชาติอื่น ๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน ดังนั้นการพัฒนากระบวนการทางชีวเคมีในการผลิตไขมันและน้ำมันจากจุลินทรีย์จึงไม่เป็นที่สนใจและนิยมอีกต่อไปในช่วงนั้น

ในปี ค.ศ. 1960 การใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการนั้นเป็นที่นิยมอีกครั้ง โดยเป็นการใช้ยีสต์ในการผลิตโปรตีน โดยใช้สารประกอบ alkane ที่เหลือจากกระบวนการกลั่นน้ำมันปิโตรเลี่ยมเป็นวัตถุดิบ ในช่วงนี้จึงเป็นยุคแห่งการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์ โดยบริษัทต่างๆ มีการนำกระบวนการนี้ไปใช้ในการผลิตเพื่อการบริโภคของมนุษย์อีกด้วย โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) นั้นไม่ได้เป็นเพียงนวัตกรรมทางความคิดเนื่องจากมีการนำไปพัฒนา เพื่อใช้ในเชิงอุตสาหกรรมโดยมีการหมักในถังหมักขนาดใหญ่ 1,500 ลูกบาศก์เมตร อย่างไรก็ตามการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากจุลินทรีย์นั้นไม่เป็นที่นิยมอีกต่อไปเมื่อกลุ่มโอเปค (Organization of Petroleum Exporting Countries-OPEC) ประกาศขึ้นราคาน้ำมันในปี ค.ศ.1970

การผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์นำมาซึ่งความสนใจในการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์อีกครั้ง (Ratledge, 1976 และ1978) เนื่องจากความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตไขมันนั้นมีมากกว่าการผลิตโปรตีน องค์ประกอบของกรดไขมันในไขมันจากจุลินทรีย์นั้นมีราคาที่แตกต่างกันถึง 0.30 -100 ดอลลาร์ต่อกิโลกรัม (Gunstone 1997,2001) ดังนั้นหากสามารถทำให้องค์ประกอบของไขมันที่ได้มีส่วนผสมของกรดไขมันที่มีความต้องการของตลาดสูง การผลิตไขมันและน้ำมันจากยีสต์ก็จะมีความคุ้มค่าต่อการลงทุน ด้วยแนวความคิดนี้ จึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์อย่างสูงสุด

ตัวอย่างการนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรม

1. การนำไขมันที่ได้จากยีสต์ไปใช้แทนโกโก้บัตเตอร์

ในปี ค.ศ. 1980 มีการพัฒนาการนำไขมันจากยีสต์มาแทนโกโก้บัตเตอร์ซึ่งเป็นไขมันที่มีราคาแพง งานวิจัยเกิดอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั้ง เนเธอแลนด์, นิวซีแลนด์, อังกฤษและแคนาดา จากงานวิจัยพบว่ายีสต์ *Cryptococcus curuatus* เป็นยีสต์ที่มีองค์ประกอบของไขมันที่ใกล้เคียงกับโกโก้บัตเตอร์มากที่สุด แตกต่างกันที่ปริมาณกรดโอเลอิกที่สูงและกรดสเตียริกที่ต่ำ ดังนั้นการทดลองจึงพยายามที่จะกำจัดหรือยับยั้งการทำงานของเอมไซม์ Δ 9 desaturase ซึ่งมีหน้าที่ในการเปลี่ยนกรดสเตียริกไปเป็นกรดโอเลอิก อย่างไรก็ตามระหว่างที่มีการทำการวิจัยอยู่นั้นปรากฏว่าราคาของโกโก้บัตเตอร์ลดต่ำลงจาก 8000 ดอลล่าร์ต่อตันเหลือเพียง 2500 ดอลล่าร์ต่อตัน งานวิจัยนี้จึงไม่เป็นที่นิยมอีกต่อไป อย่างไรก็ตามการใช้ไขมันจากยีสต์แทนโกโก้บัตเตอร์ยังคงมีอยู่ในปัจจุบันในประเทศนิวซีแลนด์และเนเธอร์แลนด์ (Davies, 1992 ; Smit และคณะ 1992) เนื่องจากใช้หางนมซึ่งเป็นของเสียจากโรงงานทำครีมชีสเป็นวัตถุดิบในการผลิต กระบวนการผลิตจึงยังมีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจอยู่

2. การผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (PUFAs) จากจุลินทรีย์

ความต้องการกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งนั้นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีการนำไปใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ ใช้เป็นยารักษาโรคทั้งในผู้ใหญ่และทารก นักโภชนาการแนะนำว่าการบริโภคกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งนั้น ช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ และยังช่วยบำรุงสายตาและสมองด้วย (Huang และ Sinclair , 1998) แหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง ในปัจจุบันนั้นได้มาจากปลาทะเลน้ำลึก ซึ่งบางชนิดนั้นเป็นอันตรายต่อมนุษย์ดังนั้นการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งจากจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งที่มีการผลิตจากจุลินทรีย์แสดงดังตารางที่ 2.3

3. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันจากจุลินทรีย์

เนื่องจากปัญหาปริมาณฟอสซิลซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันนั้นลดลงเป็นอย่างมาก ส่งผลให้ราคาน้ำมันดิบในช่วงประมาณปี 2001-ปัจจุบัน เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง การมองหาพลังงานทดแทนจึงเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจอย่างยิ่ง ไบโอดีเซลเป็นหนึ่งในพลังงานทดแทนที่ได้รับความนิยม เนื่องจากกระบวนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน และไม่มีการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือซัลเฟอร์ซึ่งเป็นก๊าซที่เป็นมลพิษออกสู่บรรยากาศ (Antolin G และคณะ, 2002 ; Lang X และคณะ, 2001 ; Vicente G และคณะ, 2006) โดยไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างไตรอัลคิวกลีเซอรอล (Triacylglycerol) กับแอลกอฮอลล์ แหล่งที่สำคัญของไตรอัลคิวกลีเซอรอลที่ใช้ส่วนใหญ่จะใช้จากน้ำมันที่ได้จากพืชเช่น น้ำมันปาล์ม เป็นต้น อย่างไรก็ตามเนื่องด้วยข้อจำกัดทางด้านพื้นที่ในการเพาะปลูกและปัญหาเกี่ยวกับภูมิอากาศ จึงมีการริเริ่มนำไขมันจากจุลินทรีย์มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล ตัวอย่างงานวิจัยที่ผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งที่มีการผลิตจากจุลินทรีย์

ชนิดกรดไขมัน	จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
γ-Linolenic acid	*Mucor rouxii*CFR -G15	Mamatha และคณะ (2008)
Arachidic acid	*Mortierella alliacea* YN-15	Berkeley และ Wu (1996)
	Mortierella schmuckeri S12	Aki และคณะ (2001)
	Mortierella sp.	Sajbidor และคณะ (1990)
Eicosapentaenoic acid	*Shewanella putrefaciens* *S. gelidimarina*	Jason Ryan และคณะ (2010)
Docosahexaenoic acid	*Thraustochytrium aureum*	Dae-Won Cho และคณะ(2002)

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างวิจัยที่มีการผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์เพื่อเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการไบโอดีเซล

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Rhodotorula glutinis *Saccharomyces cerevisiae*	Xue และคณะ (2006)
Mortierella isabellina	Lin และ Z Zhao (2007)
Lipomyces starkeyi *hodosporidium toruloides* *Rhodotorula glutinis*	Dai และคณะ (2007)

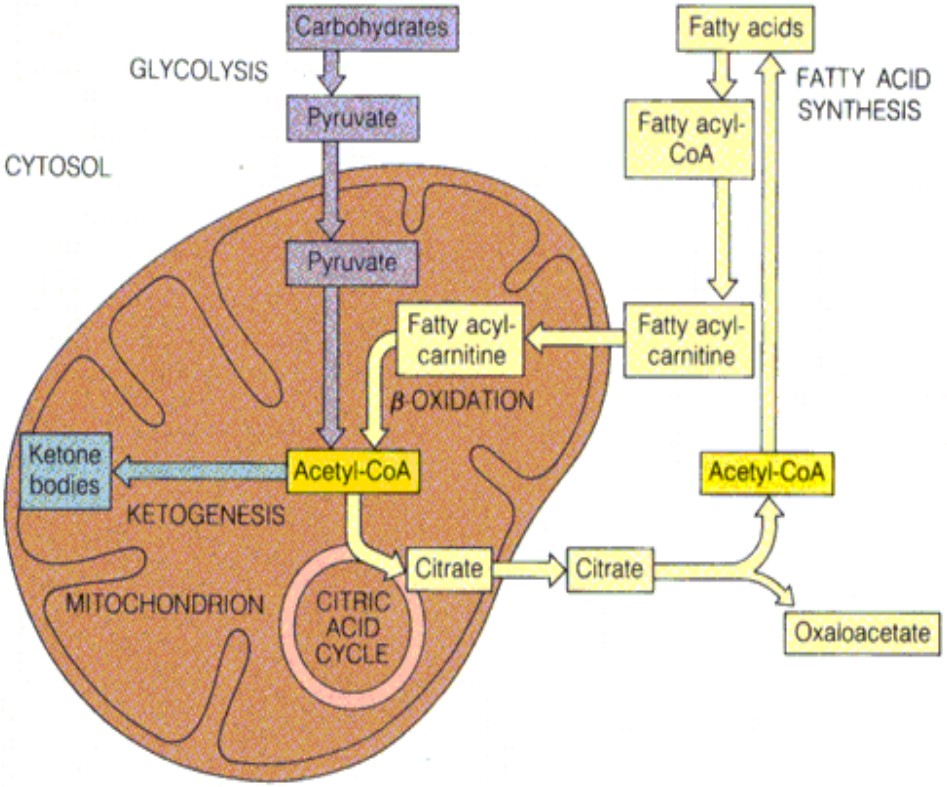
2.3 การสังเคราะห์ไขมันในยีสต์

ในขณะที่เซลล์สังเคราะห์ไขมันกระบวนการอื่นๆจะเกิดช้าลง การสะสมไขมันพบเป็นระบบแบตซ์ที่มี 2 ระยะ ระยะแรกประกอบด้วยการเจริญที่มีสารอาหารทั้งหมดที่จำเป็นอย่างสมดุล จากนั้นเกิดระยะเฟตทีนิ่ง (Fattening stage) หรือระยะลิโพจินิก (Lipogenic stage) ซึ่งเป็นระยะที่มีการสร้างไขมันหลังจากที่สารอาหารหมดยกเว้นคาร์บอนและออกซิเจน

เมื่อภายในเซลล์ยีสต์มีพลังงานเพียงพอใช้งานแล้ว เซลล์จะทำการสังเคราะห์ไขมันเพื่อเก็บไว้เป็นพลังงานสำรอง โดยจะเก็บไว้ในรูปของไทรเอซิลกลีเซอรอลซึ่งใช้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์คือ Acetyl-CoA

การสังเคราะห์ไขมันนั้นเกิดในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ซึ่ง Acetyl-CoA ที่ได้จากปฏิกิริยาการสลายกลูโคสและการสลายกรดไขมันที่มีอยู่แล้วภายในไมโทคอนเดรียนั้น เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย ดังนั้นจึงต้องมีการนำเอา Acetyl-CoA ออกจากไมโทคอนเดรียไปยังไซโตพลาสซึม แต่ Acetyl-CoA นั้นไม่สามารุซึมผ่านเยื่อหุ้มภายในของไมโทคอนเดรียออกไปได้ จึงต้องมีการเปลี่ยนรูปของ Acetyl-CoA ให้อยู่ในรูปของ Citrate โดยการรวมตัวกับ Oxaloacetate (รูปที่ 2.1)

เมื่อ Citrate ผ่านออกไปยังไซโตพลาสซึม จะเกิดการสลายโมเลกุลกลับเป็น Acetyl-CoA และ Oxaloacetate เผื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไขมันต่อไป



รูปที่ 2.1 การนำ Acetyl-CoA ออกจากไมโทคอนเดรียโดยใช้ Citrate เป็นตัวพา
(ที่มา: Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry 3rd edition. 2000; หน้า 651)

การสังเคราะห์ไขมันในยีสต์นั้นคล้ายกับการสังเคราะห์ไขมันของสัตว์ทั่วไปประเภทโปรคาริโอตและยูคาริโอต คือในขั้นต้นจะทำการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid) ซึ่งมีคาร์บอน 16 อะตอม ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงสังเคราะห์กรดไขมันที่มีคาร์บอนอะตอมมากขึ้นโดยทำการเติมคาร์บอนทีละสองอะตอมไปเรื่อยๆและเมื่อจะทำการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว เซลล์จะใช้เอนไซม์บางตัว ที่ช่วยในการเติมพันธะคู่ ขั้นตอนหลักๆของการสังเคราะห์ไขมันนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

2.3.1 การสังเคราะห์ กรดปาล์มมิติก

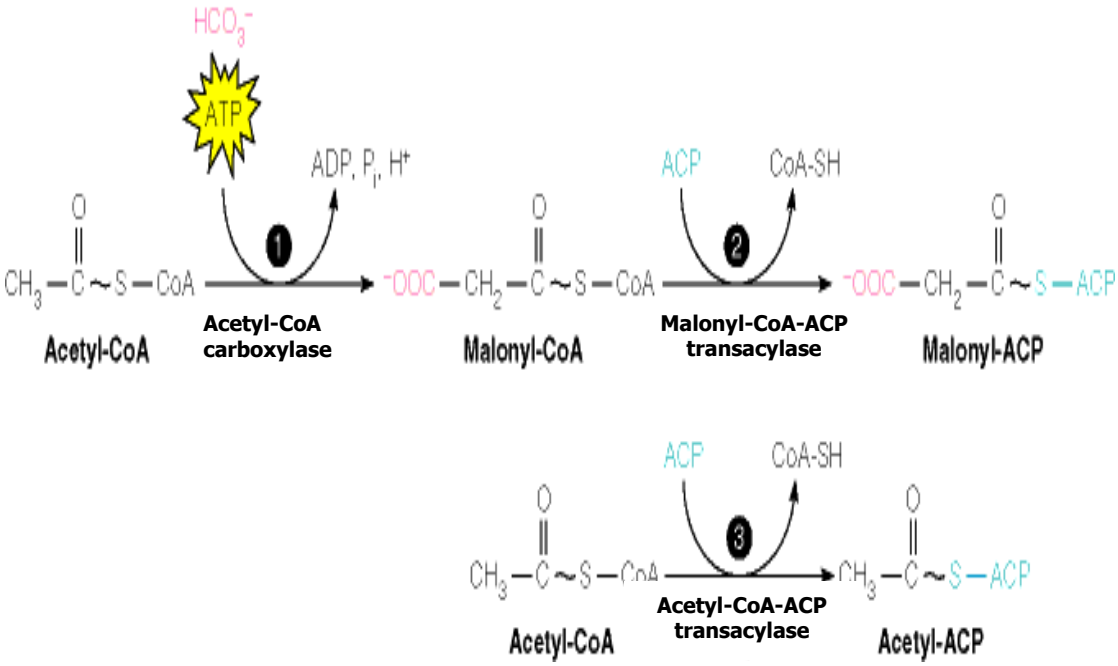
ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

2.3.1.1 การเตรียมสารตัวกลางสำหรับการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติก

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติกนั้น เริ่มต้นจากการเตรียมสารตัวกลางที่จะใช้ในปฏิกิริยาคือ Acetyl-CoA (เป็น Fatty acyl-ACP ตัวแรกในการสังเคราะห์ไขมัน) และ Malonyl-CoA ซึ่ง Malonyl-CoA นั้นสังเคราะห์มาจาก Acetyl-CoA โดยใช้เอนไซม์ Acetyl-CoA carboxylase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้พลังงานในรูปของ ATP 1 โมเลกุล สารตัวกลางทั้งสองชนิดนี้จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ ACP หรือ Acyl carrier protein ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับสารตัวกลาง (Intermediate) ในระหว่างการสังเคราะห์กรดไขมันก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้ได้ โดย Malonyl-ACP สังเคราะห์จาก Malonyl-CoA โดยอาศัยเอนไซม์ Malonyl-CoA-ACP transacylase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเป็นการเปลี่ยนตัวพาหมู่เอซิลจาก Coenzyme A มาเป็นโปรตีน ACP และในทำนองเดียวกัน Acetyl-ACP ก็สังเคราะห์จาก Acetyl-CoA โดยมีเอนไซม์ Acetyl-CoA-ACP transacylase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2.2 Acetyl-ACP นี้จะเป็นกรดไขมันตัวที่เล็กที่สุดที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไขมัน และ Malonyl-ACP นั้นจะทำหน้าที่เป็นเสมือนตัวพาคาร์บอนอะตอมในรูปของ Acetyl group ซึ่งมีคาร์บอน 2 อะตอมมาเติมให้กับ Acetyl–ACP

ในยีสต์หรือยูคาริโอตทั่วไปนั้น โมเลกุลของเอนไซม์ Acetyl-CoA carboxylase จะเป็นไดเมอร์ (Dimer) ซึ่งประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ (Polypeptide) เหมือนกัน 2 สาย โดย รูป Dimer ของเอนไซม์นี้จะเป็นรูปที่ไม่ทำงาน แต่ถ้ามาต่อกันเป็นพอลิเมอร์ (Polymerization) จะได้โมเลกุลของเอนไซม์มีรูปร่างเป็นสายยาว (Filamentous form) ซึ่งสามารถทำงานได้

Citrate สามารถกระตุ้นการเกิด polymerization ของ Dimer ให้ได้เป็นพอลิเมอร์ได้ ดังนั้นถ้ามี Citrate สูงขึ้นในไซโทพลาซึม แสดงว่ามีการนำเอา Acetyl-CoA ออกมาจากไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น โดย Citrate สามารถเร่งการสังเคราะห์กรดไขมันโดยไปกระตุ้นการเกิด polymerization ของ Dimer ให้ได้เอนไซม์รูปที่ทำงานได้นั่นเอง



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์ Malonyl-CoA, Malonyl-ACP และ Acetyl-ACP
(ที่มา: Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry . 2000; หน้า 652)

2.3.1.2 ขั้นตอนการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติก

การสังเคราะห์กรดปาล์มมิติกนั้น พบว่าประกอบไปด้วยการเติมคาร์บอนอะตอมซ้ำกันหลายๆรอบ โดยแต่ละรอบจะมีการเติมคาร์บอนทีละ 2 อะตอม และในแต่ละรอบจะมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นทั้งหมด 4 ขั้นตอนต่อเนื่องกัน (รูปที่ 2.4)

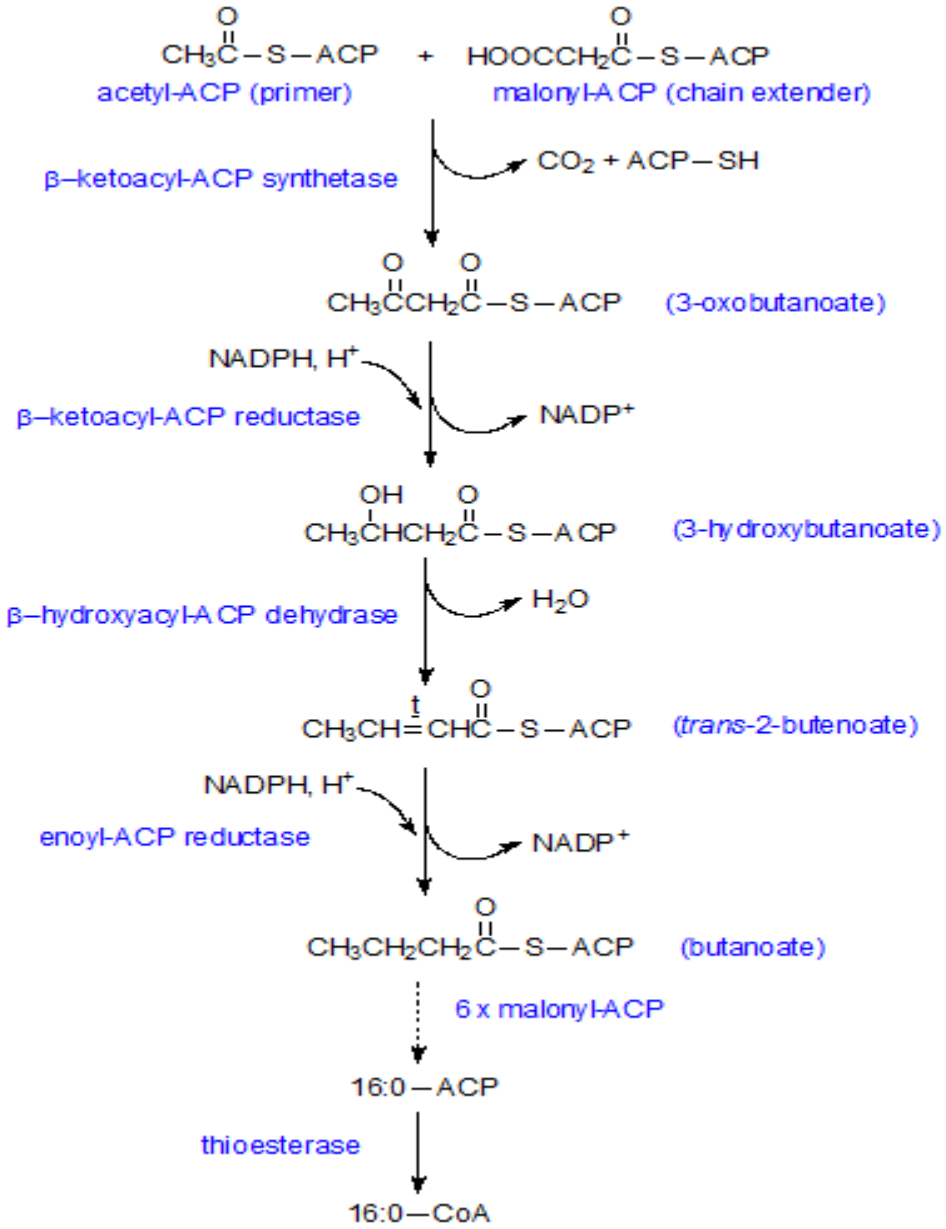
ปฏิกิริยาแรกของการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติกเป็นปฏิกิริยาการรวมตัวกัน (Condensation) ระหว่าง Malonyl-ACP และ Acetyl-ACP ได้เป็น Acetoacetyl-ACP โดยอาศัยเอนไซม์ β-ketoacyl-ACP synthase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีการปล่อย CO_2 ออกมา 1 โมเลกุล

ปฏิกิริยาที่ 2 เป็นปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ β-ketoacyl-ACP reductase เป็นการเปลี่ยนหมู่คีโท (keto group) ให้เป็นหมู่ไฮดรอกซิล โดยมี NADPH เป็นตัวให้อะตอมไฮโดรเจน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น D-3-hydroxyacyl-ACP

ปฏิกิริยาที่ 3 เป็นปฏิกิริยาการดึงน้ำออก (Dehydration) จากโมเลกุลของ D-3-hydroxyacyl-ACP โดยอาศัยเอนไซม์ 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *trans*-Δ2-Enoyl-ACP

ปฏิกิริยาที่ 4 เป็นปฏิกิริยารีดักชันครั้งที่ 2 เพื่อเติมอะตอมของไฮโดรเจนเข้าที่ตำแหน่งพันธะคู่ โดยอาศัยเอนไซม์ Enoyl-ACP reductase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมี NADPH เป็นตัวให้อะตอมไฮโดรเจน

เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาทั้งสี่ในแต่ละรอบ จะได้ Fatty acyl-ACP ที่มีจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้นรอบละ 2 อะตอม โดย Malonyl-ACP ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม เป็นตัวให้คาร์บอนทีละ 2 อะตอม และสูญเสียคาร์บอนไป 1 อะตอมในรูปของ CO_2 (ดูปฏิกิริยาที่ 1 รูปที่ 2.4)

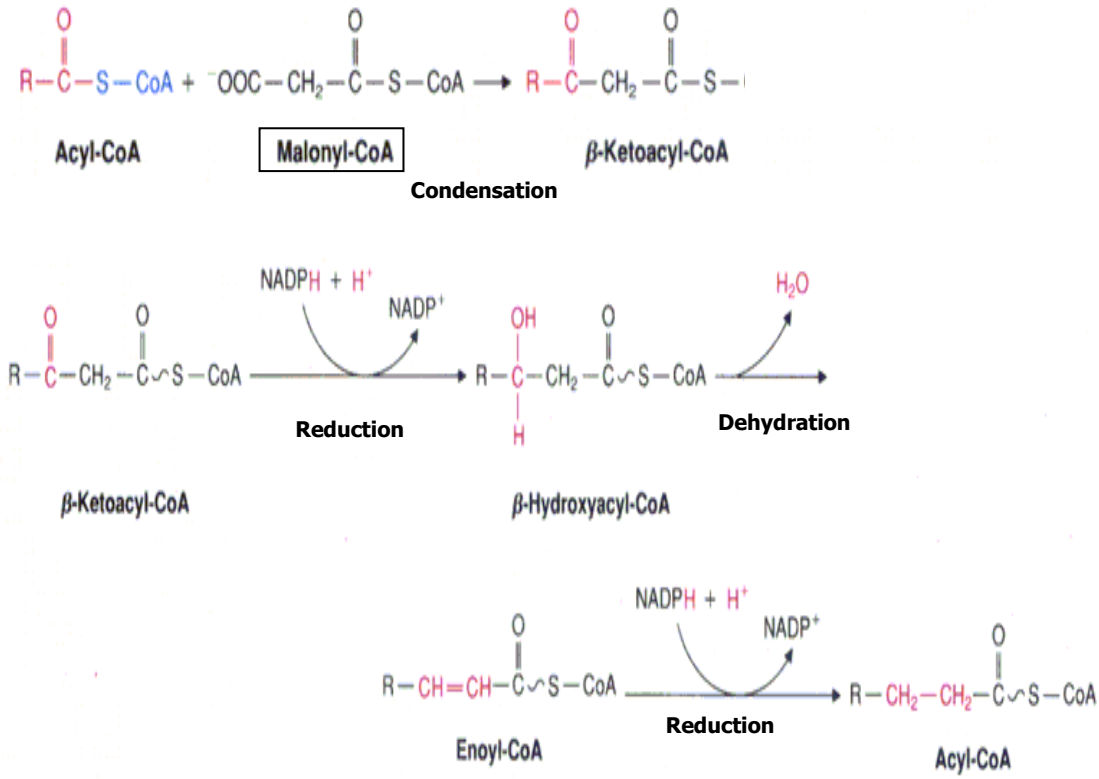


รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติก

(ที่มา Smith, S. และคณะ , 2003)

2.3.2 **การเพิ่มความยาวของกรดไขมัน** (Elongation of Fatty acid chains)

หลังจากที่เซลล์สังเคราะห์กรดปาล์มมิติกได้แล้วก็จะทำการเพิ่มความยาวของกรดไขมันโดยการเติมคาร์บอนทีละ 2 อะตอมให้กรดปาล์มมิติกเช่นเดียวกับการสังเคราะห์กรดปาล์มมิติก แต่ต่างกันตรงที่ตัวพาคาร์บอนคือ Malonyl-CoA (รูปที่ 2.5) และเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไม่ได้อยู่ในรูปของโมเลกุลเชิงซ้อน



รูปที่ 2.4 การเพิ่มความยาวของกรดไขมันใน endoplasmic reticulum
(ที่มา: Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry 3rd edition. 2000; หน้า 659)

2.3.3 **การเติมพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมัน** (Fatty acid desaturation)

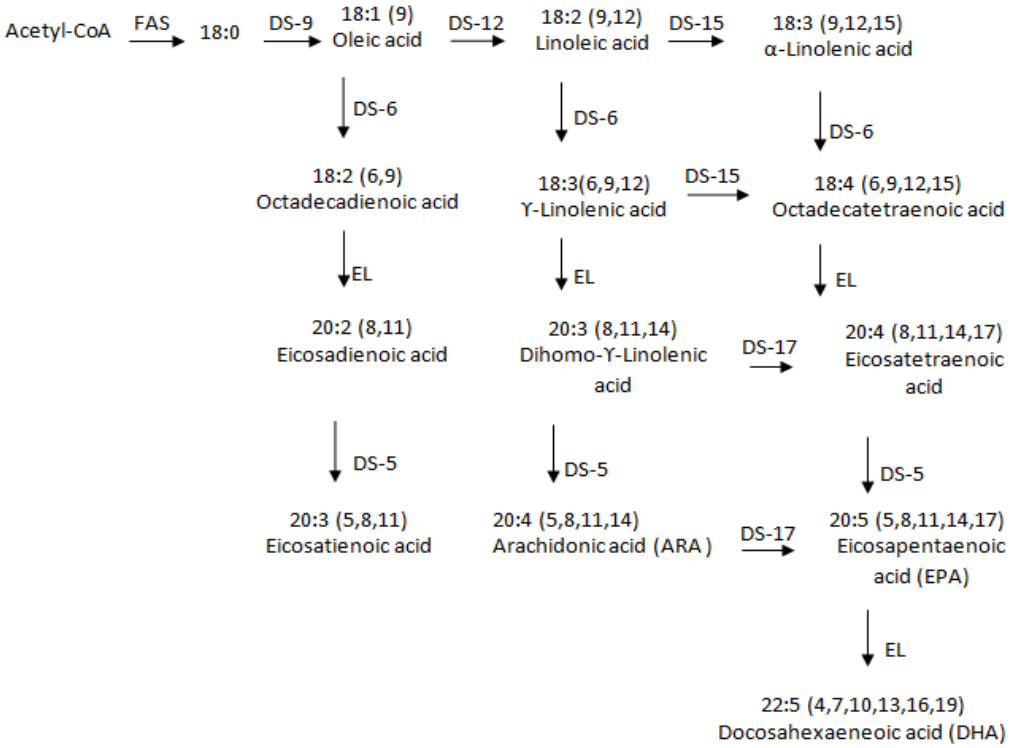
การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือการเติมพันธะคู่ให้กับกรดไขมันนั้น เริ่มต้นต่อจากกระบวนการเพิ่มความยาวให้กับกรดไขมันในหัวข้อที่ผ่านมา จากหัวข้อที่ผ่านมานั้น กรดไขมันตัวแรกที่จะได้จากการเพิ่มความยาวของกรดไขมันคือ กรดสเตียริค (C18:0) การเติมพันธะคู่ของเซลล์ยีสต์หรือยูคาริโอตนั้น การเติมพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมันเกิดขึ้นใน endoplasmic reticulum โดยอาศัยเอนไซม์ Fatty acyl-CoA desaturase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยจะมีชื่อเรียกเฉพาะของเอนไซม์ตามตำแหน่งที่เข้าทำปฏิกิริยา การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวแสดงดังรูปที่ 2.5 จากรูป FAS (fatty acid synthase) คือ กลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ไขมัน DS

(Desaturases) คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมพันธะคู่ในตำแหน่งนั้นๆ (DS-9 คือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9) และ EL (Elongase) คือการเพิ่มความยาวของกรดไขมัน (ดังที่กล่าวไปในหัวข้อ 2.3.2)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 พันธะในโมเลกุล (monounsaturated fatty acid) ที่พบมากในสัตว์ ได้แก่ Oleic acid (18:1cΔ9) และ Palmitoleic acid (16:1cΔ9) ซึ่งกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้สังเคราะห์จาก Stearic acid และ Palmitic acid ตามลำดับ โดยปฏิกิริยารวมของการสังเคราะห์ Oleic acid เป็นดังนี้

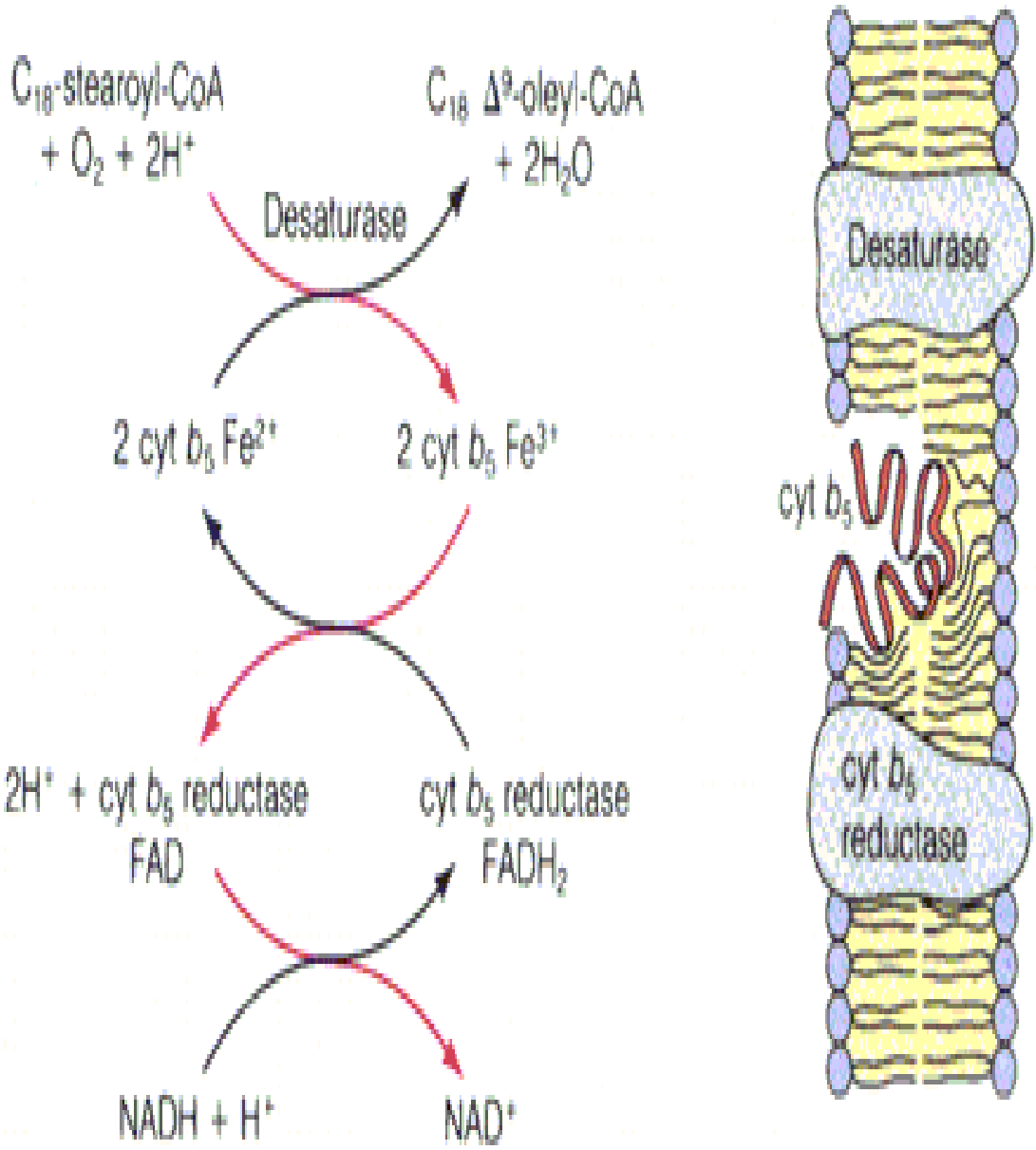
$$\text{Stearoyl-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^{+} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Oleyl-CoA} + \text{NAD}^{+} + 2\text{H}_2\text{O}$$

ปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของปฏิกิริยาข้างต้น เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome b_5 reductase รูปที่ 2.6 เป็นการแสดงตัวอย่างการถ่ายทอดอิเล็กตรอนของระบบการทำให้เกิดพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 ของกรดไขมัน โดยอาศัยเอนไซม์ Δ9 Desaturase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



รูปที่ 2.5 การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว

(ที่มา : Ratledge และ Wynn, 2002)



(ก) (ข)

รูปที่ 2.6 ระบบการทำให้เกิดพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมัน (Fatty acid desaturation system) (ก) แสดงปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกี่ยวข้อง (ข) แสดงแบบจำลองของตำแหน่งโปรตีนในปฏิกิริยา (ที่มา: Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry 3rd edition. 2000; หน้า 660)

2.4 ข้อดีของการใช้ยีสต์เป็นแหล่งไขมัน

1. เชื้อยีสต์เจริญเติบโตเร็วจึงใช้เวลาในการเลี้ยงที่น้อยกว่ามากถ้าเทียบกับพืชทั่วไป

2. ไม่ต้องคำนึงถึงสภาพภูมิอากาศ เนื่องจากสามารถกำหนดพื้นที่ในการเลี้ยงได้และพื้นที่ในการเลี้ยงไม่ต้องใช้พื้นที่มาก

3. ไขมันที่ได้ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษและเนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยว มีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนมากนักเหมือนในพืช ทำให้ง่ายต่อการควบคุมกลไกการผลิตในการที่จะเลือกผลิตภัณฑ์จำเพาะบางตัว ทำให้สามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางขึ้น (Rattray, 1984)

4. สามารถสกัดไขมันออกจากเซลล์ได้ง่ายกว่าแบคทีเรียและสาหร่าย (Laning, 1991)

5. สามารถใช้ซับสเตรตที่มีราคาถูก ใช้ได้ทั้งแหล่งคาร์บอนที่ชอบน้ำ และแหล่งคาร์บอนที่ไม่ชอบ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2006)

2.5 องค์ประกอบของไขมันที่ได้จากยีสต์

ไขมันที่ได้จากยีสต์ไขมันสูงนั้นมีลักษณะที่คล้ายกับไขมันที่ได้จากพืชและองค์ประกอบของไขมันที่ได้นั้นแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ และสภาวะในการเลี้ยงนั้นๆ องค์ประกอบส่วนใหญ่ของไขมันที่ได้นั้นคือกลีเซอไรด์ซึ่งอาจจะเป็นโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์หรือไตรกลีเซอไรด์ แล้วแต่สายพันธุ์ของยีสต์แต่ส่วนใหญ่มักจะเป็นไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งกรดไขมันที่พบในยีสต์แตกต่างกันไปโดยจะมีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 8-24 อะตอม ตัวอย่างของกรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงบางชนิดแสดงดังตารางที่ 2.5

นอกจากนั้นจะมีฟอสโฟลิปิดซึ่งเป็นไขมันชนิดที่เป็นส่วนประกอบในเซลล์เมมเบรน ฟอสโฟลิปิดที่พบในยีสต์ส่วนใหญ่เป็นฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidyl choline) เป็นส่วนใหญ่ ประมาณร้อยละ 35-50 ของฟอสโฟลิปิดทั้งหมด และมีฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidyl ethanolamine) ประมาณร้อยละ 25-32 ของฟอสโฟลิปิดทั้งหมด และส่วนน้อยจะเป็นพวกฟอสฟาติดิลอินโนซิทอล (phosphatidyl inositol) และฟอสฟาติดิลซีรีน (phosphatidyl senne) ไฮโดรคาร์บอนที่พบในยีสต์มีปริมาณไม่มากนัก โดยสารไฮ โดรคาร์บอนที่สำคัญได้แก่สควอลีนซึ่งเป็นไขมันที่ไม่มีขั้วชนิดหนึ่ง สฟิงโกลิปิดเป็นอีกหนึ่งองค์ประกอบที่พบได้ในไขมันจากยีสต์ สปิงโกลิปิดเป็นไขมันสายยาวซึ่งมีกรดไขมันต่อกับหมู่อะมิโนด้วยพันธะเอไมด์ ซึ่งรวมเรียกว่า เซราไมด์ (ceramide) และมีหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) และไนโตรเจนเบส (nitrogen base) เพิ่มเข้ามาเช่นโคลีน (choline) สเตียรอยด์ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของไซโคลเพนตาโนไฮโดรฟีแนนทรีน (cyclopentano - hydrophenanthrene) สเตียรอยด์ในยีสต์พบทั้งในรูปอิสระและในรูปเอสเทอร์ประมาณร้อยละ 0.1-1.0 ของไขมันทั้งหมดในยีสต์ ซึ่งพบว่า ส่วนใหญ่จะเป็นสารพวกเออโกสเตอรอล (ergosterol) และไซโมสสเตอรอล (zymosterol)

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างกรดไขมันในยีสต์ไขมันสูง

สายพันธุ์	ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Rhodotorula gracilis	20	2	1	42	21	8
Rhodotorula graminis	32	-	3	37	10	5
Rhodotorula glutinis	12	1.5	2	82.5	2	-
Rhodosporidium toruloides	18.1	-	16.9	58.5	3.5	2.0
Saccharomyces cerevisiae	13.3	0.8	5.1	1.2	77	-
Candida 107	37	1	14	36	8	-
Hansenula anomala	19.8	2.0	2.4	48.6	26.3	-
Candida lipolytica	17	18.1	4.8	41.8	16.6	-
Lipomyces starkeyi	30.5	-	10.7	54.1	-	-

(ที่มา Turcotte และ N.kosaric ,1989)

2.6 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไขมันในยีสต์

การผลิตไขมันจากยีสต์นั้นต้องใช้กระบวนการที่ให้ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ โดยนอกจากต้องคำนึงถึงปริมาณของไขมันที่ได้แล้ว ยังต้องคำนึงถึงคุณภาพของไขมันที่ได้อีกด้วย ดังนั้นในการศึกษาถึงกระบวนการผลิตไขมันในยีสต์แต่ละชนิดนั้น จะต้องเริ่มศึกษาถึงปัจจัยและสภาวะต่างๆที่ส่งผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของไขมัน ซึ่งปัจจัยและสภาวะที่เกี่ยวข้องได้แก่ แหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นไนโตเจน ความเข้มข้นฟอสฟอรัส ความเข้มข้นออกซิเจน อุณหภูมิเป็นต้น

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นสารอาหารที่สำคัญมากสำหรับเลี้ยงยีสต์ เนื่องจากภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง ยีสต์เป็นคีโมออร์กาโนโทรฟ (chemoorganotroph) ซึ่งต้องใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (สาวิตรี ลิ่มทอง , 2002) ส่วนใหญ่สารเคมีที่ใช้คือน้ำตาล กลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถเมแทบอลิซึมได้ แต่อาจไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เกิดเมแทบอลิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดในยีสต์ทุกชนิด แต่โดยส่วนใหญ่แล้วในการผลิตระดับอุตสาหกรรมจะไม่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากกลูโคสบริสุทธิ์ค่อนข้างมีราคาสูงหากนำมาใช้เป็นซับสเตรทแล้วจะไม่คุ้มค่าต่อการลงทุนดังนั้นส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลที่เป็นอนุพันธ์ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้ง นอกจากนั้นกลีเซอรอลก็สามารถนำมาใช้ได้เช่นกัน

มนูเทพ กนกศิลป์ (1979) พบว่าเมื่อใช้สบู่น้ำมันปาล์ม 1.0 กรัมต่อลิตรจะส่งผลต่อการผลิตไขมัน โดยการผลิตไขมันจะเพิ่มขึ้นและองค์ประกอบของไขมันที่ได้จะคล้ายกับสบู่น้ำมันปาล์มที่ใช้

Fall และคณะ (1984) พบว่า ยีสต์ *Cryptococcus* สามารถเปลี่ยน 100 กรัมของดี-ไซโลสได้เป็นกลีเซอ ไรด์ 17-23 กรัม เมื่อใช้ไซแลนเป็นซับสเตรต

Glatz และคณะ (1985) ใช้กล้วยที่สุกงอมแล้วมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Candida curvata* D พบว่า ยีสต์สามารถเจริญเติบโตและผลิตไขมันได้แต่ปริมาณไขมันที่ได้ยังมีค่าต่ำ เนื่องจากในเนื้อกล้วยนั้นมีน้ำตาลซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนน้อยเกินไป

Hausson และ Dostalek (1986) ศึกษาการใช้ กลูโคส มอลโตส และแมนนิทอล เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus albidus* var. *albidus* CBS 4517 พบว่าการผลิตไขมันของยีสต์จะมากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

Vega และคณะ (1988) ได้ใช้น้ำกล้วยผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นกัน พบว่าเชื้อ *Apiotrichum curvatum* ATCC 20509 สามารถเจริญในน้ำกล้วยได้เช่นกัน โดยพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำกล้วยร้อยละ 25 จะให้ปริมาณไขมันมากที่สุดและเมื่อเสริมด้วยแอสพาราจีนและเกลือแร่ในสูตรอาหาร จะมีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลมากขึ้น

นอกจากนี้ Johnson และคณะ (1995)ได้นำ *Rhodotorula glutinis* IIP30 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้กากน้ำตาล กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่จำกัดไนโตรเจน พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในอาหารเหลวกากน้ำตาล กลูโคสและซูโครสเท่ากับ 0.4, 0.34 และ 0.31 ต่อชั่วโมงตามลำดับ และมีการสะสมลิปิดภายในเซลล์เท่ากับ 0.78, 0.38 และ 0.39 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Akindumila และ Glatz (1998) ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดียวกันนี้ในน้ำมะเขือเทศ โดยมีการเปรียบเทียบระหว่างการเติมน้ำตาลทรายเสริมลงไปในสารอาหารกับไม่เติม พบว่า เมื่อมีการเติมน้ำตาลทรายจะได้ไขมันสูงสุด 12.97 กรัมต่อลิตรและหากไม่เติมน้ำตาลทรายเสริม จะได้ปริมาณไขมันสูงสุดเพียง 10.13 กรัมต่อลิตร

บำเพ็ญ นิ่มเขียน (2002) ได้ศึกษาการผลิตไขมันจากยีสต์ที่แยกเอง โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากแป้งมันสำปะหลัง ผลปรากฏว่าเชื้อยีสต์รหัส TD-4 ให้การผลิตไขมันที่สูงที่สุดคือร้อยละ 60.30 โดยน้ำหนักแห้ง

2.6.2 **แหล่งไนโตรเจน**

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในสารอาหาร เนื่องจากยีสต์จะมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบภายในเซลล์ประมาณร้อยละ 10 ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยส่วนใหญ่จะมีปริมาณไนโตรเจนสูงรองลงมาจากคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนมีทั้งที่เป็นสารอินทรีย์เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ พิวรีน เอมีน ยูเรีย เป็นต้น และที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซึ่งมักจะใช้ในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเฉพาะสารแอมโมเนียมซัตเฟตมักจะนิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์เพราะจะให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟตอีกด้วย แหล่งไนโตรเจนที่ดีนั้นจะต้องถูกนำเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วยขั้นตอนที่น้อยที่สุดและต้องไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นพิษต่อเซลล์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2002)

Kessell (1968) ได้รายงานถึงการผลิตไขมันและกรดไขมันของเชื้อยีสต์ *Rh.gracilis* ว่าจะถูกกระตุ้นให้มีการผลิตมากขึ้นเมื่อแหล่งไนโตรเจนถูกใช้หมดไป

มนูเทพ กนกศิลป์ (1979) พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไขมันในยีสต์ *Rhodotorula gracilis* คือเมื่อเติมโปตัสเซียมไซยาไนด์ในอาหารสังเคราะห์ 1 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น

Evans และ Retledge (1984) พบว่ายีสต์ *Rhodosporidium toruloides* CBS 14 มีปริมาณไขมันสูงขึ้นจากร้อยละ 18 โดยน้ำหนักแห้งเป็นร้อยละ 50 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นกลูตาเมต ยูเรีย หรืออาจินีน ซึ่งสอดคล้องกับ Akindumila และ Glatz (1998) ที่พบว่าเมื่อใช้แหล่งยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อ *Apiotrichum curvatum* ATCC 20509 จะได้ปริมาณไขมันสูงที่สุดเมื่อใช้ยูเรียร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักแห้ง

ในขณะที่ Johnson และคณะ (1995) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula glutinis* IIP30 ในอาหารเหลวกลูโคสที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรียและโพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น เชื้อมีการสะสมไขมันสูงสุดร้อยละ 4.1 โดยน้ำหนักแห้งเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตเจน ในขณะที่ปริมาณไขมันลดลงเหลือร้อยละ 1.7 และ 1.5 โดยน้ำหนักแห้งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมยูเรียหรือโพแทสเซียมไนเตรต

จะเห็นได้ว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ที่เลือกใช้

2.6.3 **แหล่งฟอสฟอรัส**

ฟอสฟอรัสถูกแอสซิมิเลตในรูปของไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออนหรือออร์โทฟอสเฟตไอออนเท่านั้น บทบาทหลักของฟอสฟอรัสคือเป็นองค์ประกอบของน้ำตาลฟอสเฟต กรดนิวคลีอิค และนิวคลีโอไซด์ไดฟอสเฟต หรือนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต มีความสำคัญในการควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์ ให้ฟอสเฟตสะสมและให้พลังงาน ฟอสเฟตในเซลล์ยีสต์มีอยู่ประมาณร้อยละ 3-5 ของน้ำหนักแห้ง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2002)

Wu และคณะ (2010) ทำการศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อฟอสฟอรัสที่มีค่าอยู่ระหว่าง 72-9552 ในสูตรอาหาร โดยใช้เชื้อยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 พบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อฟอสฟอรัสที่ 9552ให้ปริมาณไขมันมากที่สุดคือร้อยละ 62.1 ของน้ำหนักแห้งแม้ว่าปริมาณเซลล์สูงสุดคือ 20.6 กรัมต่อลิตรจะได้จากอัตราส่วนคาร์บอนต่อฟอสฟอรัสที่ 3398 ก็ตาม

Pakawat (2010) และคณะทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16 ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.4,1.6, 2.8 และ 4.0 กรัมต่อลิตรพบว่าเชื้อมีปริมาณไขมันสูงสุดที่ปริมาณฟอสเฟต 0.4 กรัมต่อลิตรละได้ปริมาณไขมัน 8.85 กรัมต่อลิตร

2.6.4 **อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน**

ในกระบวนการหมักยีสต์เพื่อผลิตไขมัน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตเจนของซับสเตรทนั้นเป็นตัวแปรที่สำคัญในการที่จะทำให้ได้ปริมาณไขมันสูงๆ โดยทั่วไปแล้วปริมาณไขมันที่สูงจะได้จากสภาวะที่ถูกจำกัดไนโตเจนหรือไนโตเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดไป (Ratledge, 2004)

เนื่องจากการใช้หรือการทำให้ไนโตรเจนมีปริมาณจำกัดในขณะที่ยังคงมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ มีผลให้คาร์บอนจะถูกแอสซิมิเลตและถูกเปลี่ยนเป็นไขมันโดยตรงโดยอาศัยเอนไซม์ที่จำเป็นที่จุลินทรีย์โอลีจินัสสร้างขึ้น ทั้งนี้เพราะไม่สามารถสังเคราะห์สารอื่นที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เนื่องจากสารอาหารหมด (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2002)

อัจฉราวรรณ ทองมี (1986) ทำการศึกษาเชื้อ *Rhodotorula gracilis* เพื่อผลิตไขมันพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตไขมันคือ 75 โดยจะให้ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 34.2 โดยน้ำหนักแห้ง แต่อัตราการผลิตไขมันจะสูงสุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 37

Turcotte และ Kosaric (1989) ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการเลี้ยงยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* ATCC 10788 ที่ 55:1, 77:1, 99:1 และ 121:1 พบว่า ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 77:1 ให้ปริมาณไขมันสูงสุด

ส่วน Bati และคณะ (1989) พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Candida lipolytica* 1094 คือ 124 มิลลิกรัมต่อลิตร

Granger และคณะ (1992) พบว่าอัตราส่วนไนโตเจนที่เหมาะสมและอุณหภูมิ เป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตไขมันของยีสต์ *Rhodotorula glutinis* NRRLY 1091 การเลี้ยงภายใต้สภาวะการจำกัดไนโตเจนส่งผลให้ปริมาณการผลิตไขมันเพิ่มขึ้น แต่จะไปลดปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยพบว่า ที่อัตราส่วนไนโตเจนต่อคาร์บอน 0.025 :1 จะให้การผลิตไขมันสูงสุด แต่ที่สภาวะไม่จำกัดไนโตเจน (ไนโตเจนต่อคาร์บอน 0.14:1) เซลล์จะเจริญดีที่อุณหภูมิต่ำและจะให้ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

Prapulla และคณะ (1992) พบว่าเชื้อ *Rhodotorula gracilis* CFR-1 จะให้การผลิตไขมันสูงสุดเมื่อใช้คาร์บอนร้อยละ 10.24 และไนโตรเจน 0.37 โดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 20

Somashekar และ Joseph (2000) ทำการเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันโดยศึกษาถึงผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีผลต่อการสะสมไขมันและคาโรทีนอย โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10:1, 40:1 และ 160:1 พบว่า การสะสมไขมันเกิดขึ้นสูงสุดที่ 160:1 ได้ปริมาณไขมันร้อยละ 57 โดยน้ำหนักแห้งแต่ปริมาณแคโรทีนอยสูงสุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตเจน 10 :1

Pakawat และคณะ (2010) ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 65:1, 90:1, 115 :1และ 140:1 พบว่าที่ 140:1 ให้ปริมาณไขมันสูงที่สุดคือร้อยละ 62.30 โดยน้ำหนักแห้ง โดยใช้เปปโตนและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

Wu และคณะ (2010) ทำการศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีค่าอยู่ระหว่าง 6.1:1 ถึง 22.3:1 ในสูตรอาหาร โดยใช้เชื้อยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 พบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 22.3:1 ให้ปริมาณไขมันมากที่สุดคือร้อยละ 63.3 ของน้ำหนักแห้งแม้ว่าปริมาณเซลล์สูงสุดคือ 20.3 กรัมต่อลิตร จะได้จากอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 14.3:1 ก็ตาม

2.6.5 ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนมีผลกระทบบ้างเล็กน้อยต่อการเจริญและการเพิ่มปริมาณเซลล์ การผลิตไขมันของยีสต์มีความต้องการปริมาณออกซิเจนต่ำ เนื่องจากการสังเคราะห์ไขมันเกิดจากปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนต้องเพียงพอเพื่อให้เซลล์เจริญคือประมาณ 1-3 โมลต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง

Pan และคณะ (1949) พบว่าการเปลี่ยนแปลงอัตราการให้ออกซิเจนระหว่าง 0.1-1 vvm^{-1} ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยต่อการใช้น้ำตาลของเชื้อ *Rh.gracilis* แต่ไม่ส่งผลต่อปริมาณเซลล์และการผลิตไขมัน

Naganuma และคณะ (1985) พบว่ายีสต์ Lipomyces starkeyi เป็นยีสต์ที่ต้องการออกซิเจนสูง (high aerobic yeast) เนื่องจากที่ระดับออกซิเจนต่ำจะทำให้ปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันลดลง

Davies และคณะ (1990) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อกระบวนการผลิตไขมันของยีสต์ *Apiotrichum curvatum* ATCC 20509 ซึ่งใช้เคซีนเป็นซับสเตรท พบว่าที่ระดับออกซิเจน 4-5 มิลลิโมลต่อชั่วโมง เป็นระดับที่จะทำให้การหมักเกิดขึ้นได้ดี

2.6.6 อุณหภูมิ

ปกติจุลินทรีย์จะเจริญเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ การเพาะเลี้ยงยีสต์ส่วนใหญ่มักบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดลงเมื่อเพาะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสและจะไม่เจริญเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส (Halasz และLasztity, 1991)

Kates และ Baxter (1962) พบว่าในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Candida* เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 10 องศาเซลเซียสเป็น 25 องศาเซลเซียสจะได้ปริมาณไขมันเท่าเดิมแต่องค์ประกอบของกรดไขมันในไขมันที่ได้เปลี่ยนไปสอดคล้องกับ Thorpe และ Ratledge (1973) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ชนิดเดียวกันแต่เพิ่มอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียสเป็น 40 องศาเซลเซียสซึ่งได้ผลการทดลองในทางเดียวกัน

Enebo และ Iwamoto (1966) พบว่าปริมาณไขมันของเชื้อยีสต์ *Rh.gracilis* ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 27 องศาเซลเซียสเป็น 35 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ Goulet (1975) ได้ทำการเปรียบเทียบค่าพลังงานที่ยีสต์ *Rh.glutinis* Mas Y-3748ใช้ในการสังเคราะห์ไขมันกับการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 23-31 องศาเซลเซียสมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าการสังเคราะห์ไขมัน

Ggierhart (1984) พบว่าในช่วงอุณหภูมิสูงจะทำให้มีการผลิตไขมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวส่วนที่อุณหภูมิต่ำจะผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว

Granger (1992) และคณะพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula glutinis* NRRLY 1091 ที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้ได้กรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง โดยที่ 25 องศาเซลเซียส จะให้การผลิตแอลฟ่าลิโนเลนิคสูงสุด

Johnson และคณะ (1995) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula glutinis* IIP30 ในอาหารเหลวกลูโคสโดยการเลี้ยงแบบกึ่งกะภายใต้สภาวะจำกัดไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 26, 28, 30, 32, 35 และ 38 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียสเชื้อมีปริมาณไขมันสูงสุดใกล้เคียงกันคือที่ร้อยละ 65 และ 66 ตามลำดับ

2.6.7 **ความเป็นกรดเบส**

ค่าความเป็นกรดเบสหรือค่าพีเอชมีผลต่อกิจกรรมทางชีววิทยาและการสะสมไขมันของเซลล์รวมถึงองค์ประกอบของไขมันที่ได้น้อยกว่าปัจจัยอื่นๆ (Rattray และคณะ, 1975) เนื่องจากเซลล์สามารถควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออนภายในเซลล์ได้อย่างดีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเบสภายนอกเซลล์ ค่าความเป็นกรดเบสของอาหารภายนอกอาจมีผลต่อโครงสร้างและสภาพให้ซึมผ่านได้ของเซลล์ (cell permeability) (สาวิตรี ลิ่มทอง , 2002) โดยปกติอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์จะมีค่าความเป็นกรดเบสอยู่ในช่วง 4-5 (Halasz และ Lasztity, 1991) และพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตไขมันจะอยู่ที่ 5.5 (มนูเทพ กนกศิลป์, 1989 ; Hall และ Ratledge, 1977 ; Yoon และ Rhee, 1983 ; Moeton, 1985 ; Hasson และ Dostalek, 1986 ; Suutari และคณะ, 1993)

Kessell (1968) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเบสที่มีต่อการสะสมไขมันในเชื้อ *Rh.gracilis* โดยทำการเลี้ยงที่ความเป็นกรด -เบสเริ่มต้น 3.0, 4.5 และ 6.0 พบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น 6.0 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 15 กรัมต่อลิตร

Moon และคณะ (1978) ศึกษาการผลิตไขมันของเชื้อ *Candida curvata* และ *Trichosporon cutaneum* พบว่าค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมคือช่วง 5.4-5.8 ซึ่งสอดคล้องกับ Hammond และคณะ (1985)

Davies และคณะ (1985) พบว่าค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันของเชื้อ *Apiotrichum curvatum* คือที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 แต่ Ykema และคณะ (1985) ศึกษาเชื้อเดียวกันนี้แต่ได้ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมที่ 4.8

ส่วน Naganuma และคณะ (1986) พบว่ายีสต์ *Lipomyces starkeyi* มีการผลิตไขมันที่ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.9

Johnson และคณะ (1995) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula glutinis* IIP30 ในอาหารเหลวกลูโคสโดยการเลี้ยงแบบกึ่งกะภายใต้สภาวะจำกัดไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่ค่าความเป็นกรดเบส 3, 4, 5 และ 6 พบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบส 4 ให้การปริมาณไขมันมากที่สุดคือร้อยละ 66โดยน้ำหนักแห้ง

นอกจากนี้ Li และคณะ (2006) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Rhodosporidium toruloides* Y4 โดยใช้อาหารเหลว YEPD ที่มีค่าความเป็นกรดเบสที่ 3,4,5,6,7,8,9 และ 10 นั้น พบว่า ค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนไป ไม่ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญต่อการสะสมไขมันของเชื้อ โดยเชื้อสามารถเจริญเติบโตและสะสมไขมันได้ในช่วงค่าความเป็นกรดเบสที่กว้างคือ 3-10 และค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมที่สุดคือ 6.0 โดยให้ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 72 โดยน้ำหนักแห้ง

Pakawat และคณะ (2010) ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16 ที่ค่าความเป็นกรดเบส 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 พบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบส 5.5 ได้ปริมาณไขมันสูงสุดคือร้อยละ 71.30 โดยน้ำหนักแห้ง

2.7 น้ำเชื่อมเหลือทิ้งจากโรงงานมะยมดอง

กระบวนการผลิตไขมันจากยีสต์นั้นเป็นที่ศึกษากันมายาวนานและแพร่หลายจนกระทั่งปัจจุบัน การทดลองในตอนเริ่มต้นของการนำยีสต์มาผลิตลิปิดจะเกี่ยวข้องกับการศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างยีสต์ที่เป็นยีสต์ไขมันสูงกับยีสต์ที่ไม่ใช่ยีสต์ไขมันสูงและกระบวนการการสังเคราะห์ไขมันในยีสต์ไขมันสูง เพื่อที่จะหาสภาวะที่จะทำให้เกิดการผลิตไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ จนเป็นที่ทราบกันว่าการที่ยีสต์จะผลิตไขมันได้สูงนั้นจะเกิดในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นขาดไนโตรเจน แต่ยังมีปริมาณคาร์บอนเหลืออยู่ ทำให้เซลล์จะมีการแอดซิมิแลสคาร์บอนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ไขมันต่อไป จากนั้นการทดลองจะมุ่งเน้นไปในทางการศึกษาถึงผลกระทบของสภาวะแวดล้อมต่างๆที่มีผลต่อการผลิตไขมันเช่น ค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิเป็นต้น อย่างไรตามแม้จะมีงานวิจัยมากมายที่รายงานถึงสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ แต่กระบวนการผลิตนั้นๆก็ยังเป็นกระบวนการที่ไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจด้วยข้อจำกัดด้านการลงทุน ดังนั้นการนำวัตถุดิบที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ในการหมักเพื่อผลิต

ไขมันจากยีสต์นั้นจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไขมันของยีสต์แสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งในการผลิตไขมัน

วัตถุดิบ	จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Bananas	*Candida curvata D*	Glatz และคณะ, 1985
Beet pulp extract	*Rhod*otorula *gracilis*	Atamanyuk DI และคณะ, 1978
Corn steep liquor	*Rhodosporidium.toruloides*	Picataggio SK และ Vakar LI, 1976
Molasses	*Rhod*otorula *gracilis*	Allen LA และคณะ, 1964
Potato chip waste water	*Rhod*otorula *glutinis*	Simard RE และคณะ, 1973
Starch	*C.utilis*	Atamanyuk DIและ Vakar LI, 1976
Whey	*Rhod*otorula *gracilis*	Atamanyuk DIและ Vakar LI, 1975
prickly-pear juice	*Cryptococcus curoatus*	M. Hassan และคณะ, 1994

ผลไม้เชื่อมเป็นสินค้าที่หาได้ทั่วไปในเมืองไทย กระบวนการผลิตผลไม้เชื่อมนั้นเป็นกระบวนการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนและมีความถี่ในการผลิตต่อเดือนค่อนข้างสูง เนื่องมาจากความต้องการของตลาดและข้อจำกัดด้านความสดใหม่ของผลิตภัณฑ์ น้ำเป็นส่วนประกอบสำคัญในกระบวนการผลิตผลไม้เชื่อม โดยจะใช้น้ำเป็นส่วนประกอบในการเชื่อมประมาณร้อยละ 50 ของส่วนผสมทั้งหมด ดังนั้นจึงมีปริมาณน้ำเชื่อมเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตมาก โดยบางส่วนจะใช้ในการบริโภค แต่ส่วนที่เหลือทิ้งทั้งหมดมีปริมาณมาก แนวคิดในการนำน้ำเชื่อมเหลือทิ้งจากกระบวนการเชื่อมมาใช้ประโยชน์จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เนื่องจากมีน้ำตาลซึ่งอยู่ในรูปของน้ำตาลซูโครสอยู่ประมาณร้อยละ 66 ของน้ำเชื่อม และยังอุดมไปด้วยแร่ธาตุ หรือสารอาหารต่างๆที่ได้มาจากผลไม้ เช่น วิตามินซี วิตามินบี 2 วิตามินบี 1 เบต้าแคโรทีน เหล็ก ฟอสฟอรัส แคลเซียม คาร์โบไฮเดรท โปรตีน พลังงาน อีกทั้งยังมีแคลเซียมซึ่งได้มาจากกระบวนการแช่น้ำปูนใสหรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ก่อนการเชื่อม เพื่อช่วยในเรื่องของการคงตัวของเนื้อผลไม้หลังเชื่อมอีกด้วย ซึ่งแร่ธาตุหรือสรอาหารเหล่านี้จะสูญเสียบางไปเนื่องจากกระบวนการให้ความร้อนในการเชื่อม แต่ก็ยังคงมีอีกเหลือตกค้างอยู่ในน้ำเชื่อมอยู่ ทำให้มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นเหล่งอาหารเพื่อผลิตไขมัน อีกทั้งยังน่าสนใจในแง่ของความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นซับสเตรทที่ไม่

ต้องลงทุน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งจากโรงงานมะยมในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ไขมันสูง

รูปที่ 2.7 โรงงานและลักษณะมะยมที่ได้จากการเชื่อม

บทที่ 3
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) SS-325, TOMY, Japan

3.1.2 Vertical Laminar flow (VS-124, ISSCO , U.S.A.)

3.1.3 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled Environment Incubator Shaker)

3.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuger) Kubota 5100 apan, Kubota Corporation, Japan

3.1.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) UV-2450, Shimadzu, Japan

3.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH Meter) MP220, Mettler Toledo, Switzerland

3.1.7 เครื่องวิเคราะห์น้ำตาล(Industrial Analyzer YSI Model 27) Yellow Springs Instrument Co., U.S.A.

3.1.8 ตู้อบ (Hot Air Oven) ULM 500, Memmert, Germany

3.1.9 ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 1 ลิตร Biostat Q® , B Braun Biotech International, Germany

3.1.10 อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 น้ำตาลกลูโคส (Ajax Finechem, Australia)

3.2.2 น้ำตาลซูโครส (Ajax Finechem, Australia)

3.2.3 น้ำเชื่อมเหลือทิ้ง จากโรงงาน P.K. Fruit Co. Ltd., Thailand

3.2.4 โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.5 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.6 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) (Himedia , India2)

3.2.7เอทานอล (C_2H_5OH) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.8 คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.9 เมทานอล (CHOH) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.10 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) (Ajax Finechem, Australia)

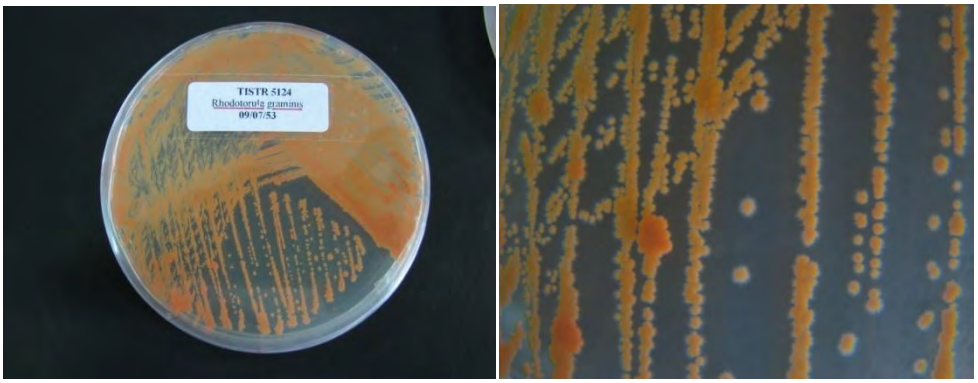
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาการผลิตไขมัน

3.3.1 *Rhodosporidium toruloides* stain 5123

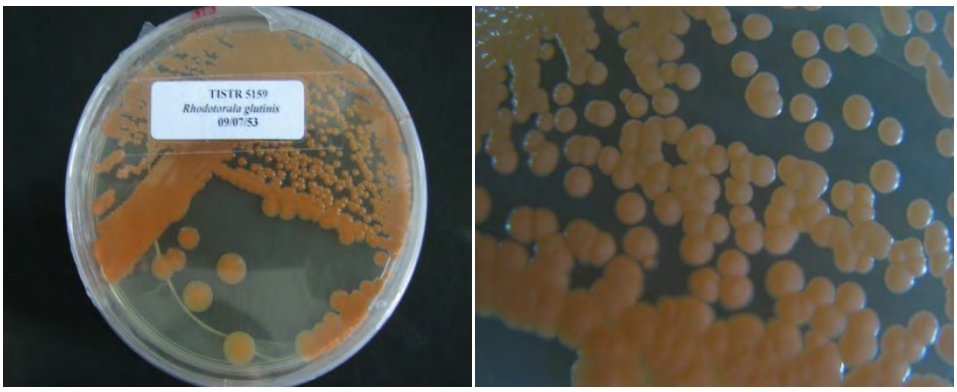
3.3.2 *Rhodotorula graminis* stain 5149

3.3.3 *Rhodotorula glutinis* stain 5129

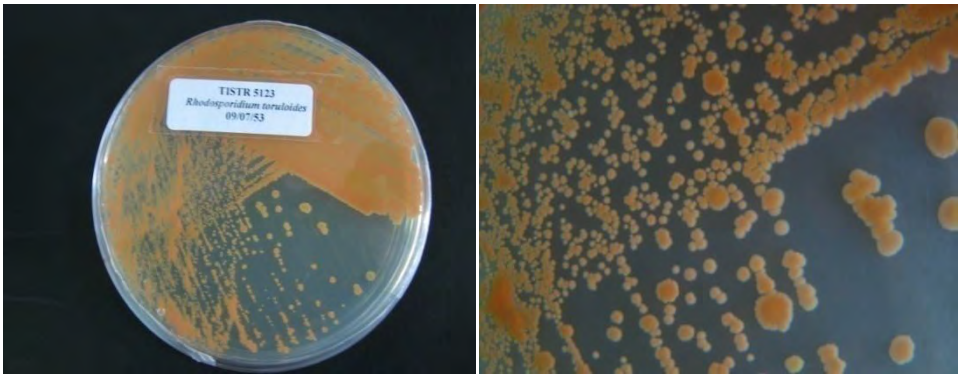
จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 3.1 (ก) เชื้อยีสต์ *Rhodotorula graminis* stain 5149

(ข) เชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis* stain 5129

(ค) เชื้อยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* stain 5123

3.4 การออกแบบการทดลอง

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อยีสต์ที่ได้จากศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยมาขยายเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง YPDa หลังจากทำการเขี่ยเชื้อแล้วให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วันเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ก่อนที่จะนำส่วนหนึ่งไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส และอีกส่วนหนึ่งนั้นให้นำไปขยายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการทำการทดลอง โดยนำเชื้อยีสต์ที่เก็บรักษาไว้บนอาหารแข็ง YPDa เขี่ยลงในอาหารเหลว YPD แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงนำไปใช้เป็นหัวเชื้อซึ่งใช้วิธีการเดียวกันทั้ง 3 สายพันธุ์

3.4.2 การเติมหัวเชื้อและการหมัก

สำหรับในทุกๆการทดลองระดับขวดเขย่า เมื่อเตรียมหัวเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆตามต้องการเรียบร้อยแล้ว ขั้นต่อไปจะทำการปิเปตหัวเชื้อที่เตรียมจาก 3.4.1 นำไปเจือจางเพื่อให้สามารถนำไปวัดค่าความขุ่นได้ จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 550 นาโนเมตร คำนวณปริมาตรหัวเชื้อที่ต้องใช้จากสูตร

$$V_1 = \frac{(N_2 \times V_2)}{N_1}$$

โดยที่ V_1 คือ ปริมาตรหัวเชื้อที่ต้องใช้ (มิลลิลิตร)

V_2 คือ ปริมาตรอาหารหมัก (มิลลิลิตร)

N_1 คือ ค่าความขุ่นของหัวเชื้อ

N_2 คือ ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นในอาหารสำหรับลงหมัก

กำหนดให้ค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นในอาหารสำหรับลงหมักอยู่ที่ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรและปริมาตรอาหารที่จะใช้หมักคือ 250 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เมื่อทำการลงหัวเชื้อเรียบร้อยแล้วนำไปใส่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาทีในสภาวะที่ใช้ในการทดลองขั้นต่างๆ เป็นเวลา 120 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง

3.4.3 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะเก็บครั้งละ 35 มิลลิกรัม โดยจะแบ่งเป็น 3 ส่วนคือส่วนที่หนึ่งใช้ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งปริมาตร 10 มิลลิกรัม ส่วนที่สองใช้ในการวิเคราะห์หาไขมันปริมาตร 20 มิลลิกรัม และส่วนสุดท้ายใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาตร 5 มิลลิกรัม เมื่อ

ทำการเก็บตัวอย่างใส่หลอดทดลองตามแต่ละส่วนแล้วจะนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตไขมันได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยน้ำเชื่อมเหลือทิ้ง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตไขมันของยีสต์ 3 สายพันธุ์คือ *Rs.toruloides*, *R.glutinis*, *R.graminis* ซึ่งสายพันธุ์ที่คัดเลือกมานี้เป็นสายพันธุ์ที่มีการศึกษามาแล้วว่าให้ปริมาณไขมันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณที่สูงและเป็นสายพันธุ์ที่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มีการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ดังกล่าว ทำให้ง่ายต่อการหาซื้อหัวเชื้อและมีความมั่นใจได้ว่าหัวเชื้อที่ได้มานั้นไม่มีการปนเปื้อน โดยในขั้นต้นจะทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุดในสภาวะที่ใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์หรือปริมาณของแหล่งคาร์บอนนี้เป็นอิทธิพลหลักที่มีต่อการผลิตไขมันของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงได้ใช้เป็นตัวแปรในการคัดเลือกเชื้อที่จะนำมาทำการทดลองต่อ โดยจะทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ชนิดนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 50, 100 และ 200 กรัมต่อลิตรซึ่งเป็นค่าที่ทำการศึกษามาแล้วว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ชนิดจะสามารถผลิตไขมันได้ดีในช่วงนี้ โดยไม่มีการควบคุมความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารและไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสลงไปในอาหาร ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ใช้ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที จากนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์หรือไขมันสูงที่สุดในค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมไปทำการทดลองต่อ

3.4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของเชื้อที่คัดเลือกได้

3.4.5.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการผลิตไขมัน

เตรียมสารอาหารน้ำเชื่อมเหลือทิ้งตามวิธีในภาคผนวก ก แต่แปรผันการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส ที่ 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 โดยควบคุมค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 และใช้เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 เช่นกัน บ่มที่อุณหภูมิที่ห้องใช้ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 120 ชั่วโมงและทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้และความเข้มข้นเซลล์ตามช่วงเวลาการหมัก

3.4.5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไขมัน

เตรียมสารอาหารน้ำเชื่อมเหลือทิ้งตามวิธีในภาคผนวก ก แล้วทำการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส ที่เหมาะสมดังที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 แต่ทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการบ่มที่

20, 28, 35, 40 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 มาบ่มที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 เช่นกัน โดยบ่มที่อุณหภูมิที่ห้องใช้ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 120 ชั่วโมงและทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง

3.4.5.3 การศึกษาความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตไขมัน

เตรียมสารอาหารน้ำเชื่อมเหลือทิ้งตามวิธีในภาคผนวก ก แล้วทำการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมดังที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 และใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5.2 แต่แปรผันความเข้มข้นไนโตรเจนที่ใช้โดยใช้ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 มาบ่มที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 เช่นกันโดยบ่มที่อุณหภูมิที่ห้องใช้ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 120 ชั่วโมงและทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง

3.4.5.4 การศึกษาความเข้มข้นฟอสเฟตที่เหมาะสมในการผลิตไขมัน

เตรียมสารอาหารน้ำเชื่อมเหลือทิ้งตามวิธีในภาคผนวก ก แล้วทำการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส ที่เหมาะสมดังที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 โดยใช้อุณหภูมิและความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5.2 และ 3.4.5.3 ตามลำดับ แต่แปรผันความเข้มข้นฟอสฟอรัสที่ใช้โดยใช้ความเข้มข้น KH_2PO_4 ที่10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากนั้นจึงนำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 มาบ่มที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.4.4 เช่นกัน

3.4.6 ศึกษาการผลิตไขมันของเชื้อและสภาวะที่คัดเลือกได้โดยใช้ กระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 3 ลิตร

เตรียมสารอาหารน้ำเชื่อมปริมาตร 2 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยแยกเป็นสองส่วน คือ สารละลายน้ำเชื่อมเหลือทิ้งจะทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนสารอาหารอื่นๆ เตรียมตามสูตรอาหารที่ต้องการใช้ และถ่ายลงถังหมักนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเทกล้าเชื้อว่องไว (active inoculum) ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เตรียมไว้ในขวดเขย่าลงในถังหมัก โดยใช้สภาวะการหมักที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5 และระหว่างการหมักควบคุมค่าความเป็นกรดเบส (pH) ที่เหมาะสมโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 นอร์มอล และควบคุมอุณหภูมิโดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ปรับความเร็วรอบเครื่องกวนในถังหมักที่ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ใช้เวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.33 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

บทที่ 4
ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเชื่อมเหลือทิ้ง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเชื่อมโดยส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลการวิเคราะห์เป็นไปดังตารางที่ 4.1 จากตารางพบว่า มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลที่ใช้ในการเชื่อมผลไม้นั้น เหลืออยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีความเข้มข้นไนโตรเจนอยู่อีกจำนวนหนึ่งซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อได้อีกด้วย ดังนั้นการทดลองต่อไปในขั้นต้นจึงทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์โดยใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งอาหารเพียงอย่างเดียว ไม่มีการเติมแร่ธาตุใดๆลงไปและไม่ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นรวมถึงไม่มีการควบคุมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก เพื่อดูประสิทธิภาพในการใช้น้ำเชื่อมเพื่อผลิตไขมันของเชื้อแต่ละชนิด

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของน้ำเชื่อมผลไม้เหลือทิ้ง

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นขององค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)
ไขมัน	9.7
น้ำตาลซูโครส	550
โปรตีน	2.4

4.2ผลการศึกษาผลของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ ต่อการผลิตไขมัน

ผลการศึกษาสายพันธุ์ของยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตไขมันโดยใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50, 100 และ 200 กรัมต่อลิตรในการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis*, *Rs.toruloides* และ *R. graminis* ที่อุณหภูมิห้องและไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส ผลการทดลองที่ได้เป็นดังนี้

4.2.1 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R.glutinis* ที่ความเข้มข้น น้ำตาลรีดิวซ์ 50, 100 และ 200 กรัมต่อลิตร

ผลการศึกษากระบวนการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* โดยใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (ก) เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่า เชื้อ *R. glutinis* มีระยะปรับตัว (lag phase) ประมาณ 36 ชั่วโมง ซึ่ง

เป็นระยะการปรับตัวให้เข้ากับอาหารชนิดใหม่คือ น้ำเชื่อมผลไม้ซึ่งมีสารอินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก จึงทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์นั้นมีน้อย จากนั้นเมื่อเชื้อสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้แล้ว จึงมีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้หลังจาก 36 ชั่วโมง มีการเพิ่มแบบทวีคูณ (log phase) และให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 13.880 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 120 ของการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากในการเลี้ยงเชื้อนี้ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีค่าไม่สูง ดังนั้นจึงทำให้เชื้อยีสต์มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์หมดก่อนเวลา 120 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณไขมันที่ผลิตได้ มีค่าไม่สูงมากนัก ให้ผลได้ไขมันเท่ากับร้อยละ 6.282 โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่อัตราการผลิตไขมันสูงสุดเท่ากับ 0.024 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิตไขมันได้ 2.899 กรัมต่อลิตร

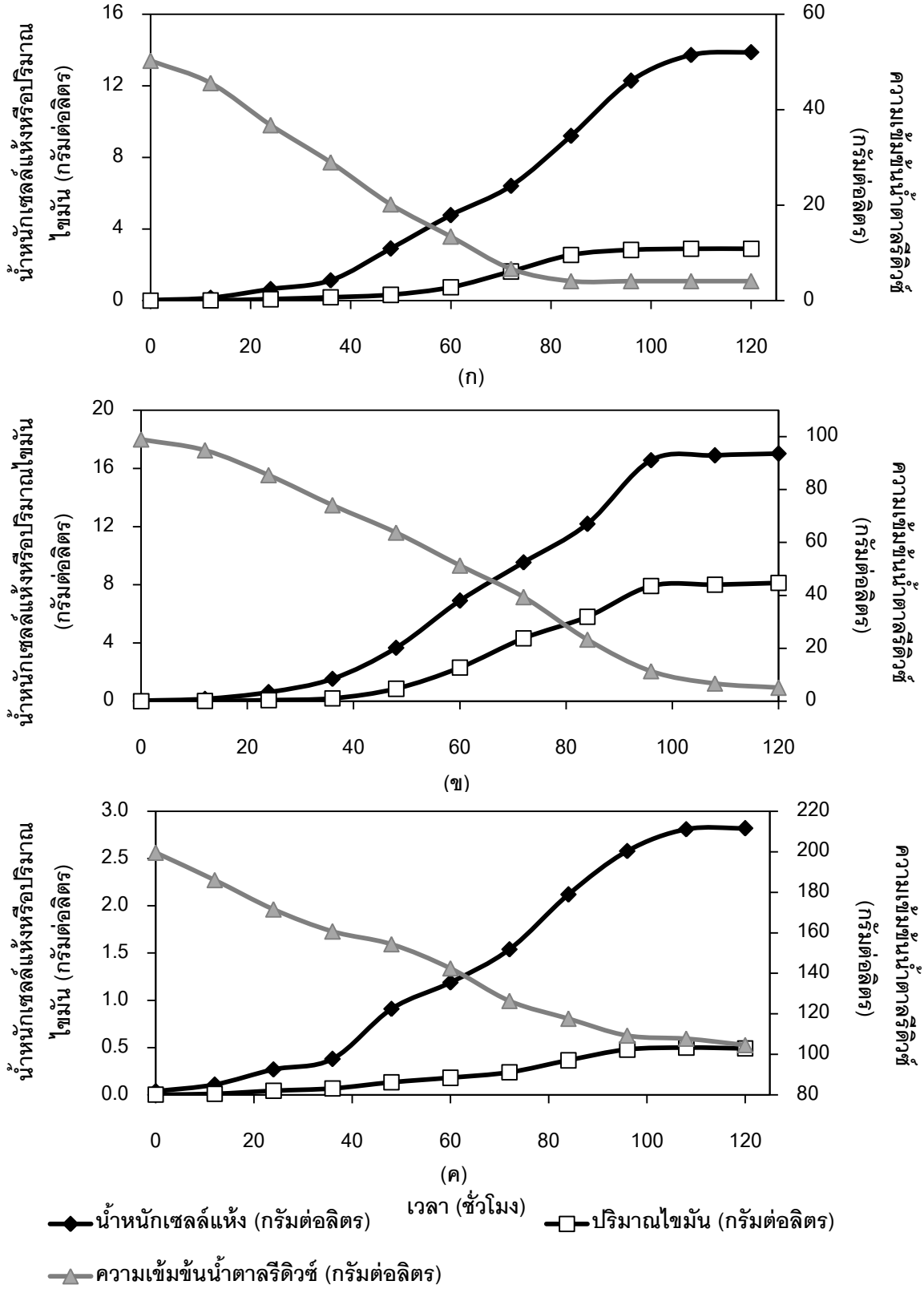
ส่วนผลการศึกษาในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.1 (ข) เมื่อพิจารณารูปแบบการเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีลักษณะการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน คือ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไขมันที่ได้นั้นมีสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ส่วนระยะเวลาการปรับตัวของเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตรนั้น มีระยะเวลาเท่ากับที่ใช้ในความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร นั่นคือ หลังจาก 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ที่ 1.540 กรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อเชื้อยีสต์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ ที่ชั่วโมงที่ 48 และ 60 โดยให้น้ำหนักแห้งเป็น 3.670 และ 6.910 กรัมต่อลิตร และปริมาณไขมันที่ได้เพิ่มขึ้นตามเวลาและน้ำหนักเซลล์แห้งคือ ที่ชั่วโมงที่ 36, 48 และ60 ให้ปริมาณไขมัน 0.198, 0.860 และ 2.310 กรัมต่อลิตร จากนั้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 108 การผลิตไขมันที่ได้มีแนวโน้มคงที่และได้ปริมาณไขมันสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 คือ 8.130 กรัมต่อลิตร ผลได้ไขมันเท่ากับร้อยละ 8.663 โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่อัตราการผลิตไขมันสูงสุดเท่ากับ 0.067 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีในระบบนั้น มีการลดลงที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ และแปรผกผันกับระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไป 98.973 กรัมต่อลิตร

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ เป็น 200 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1 (ค) โดยระยะเวลาการปรับตัว 36 ชั่วโมง เช่นกัน ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและไขมันเป็น 0.380 และ 0.070 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไขมันที่ได้มีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะอื่น การเจริญเติบโตและการผลิตไขมันเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไขมันสูงที่สุดที่ชั่วโมงสุดท้ายคือ 2.820 และ 0.492 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อนั้น พบว่า สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้เพียง 94.880 กรัมต่อลิตร หรือประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด จึงอาจกล่าวได้ว่า ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 200 กรัม

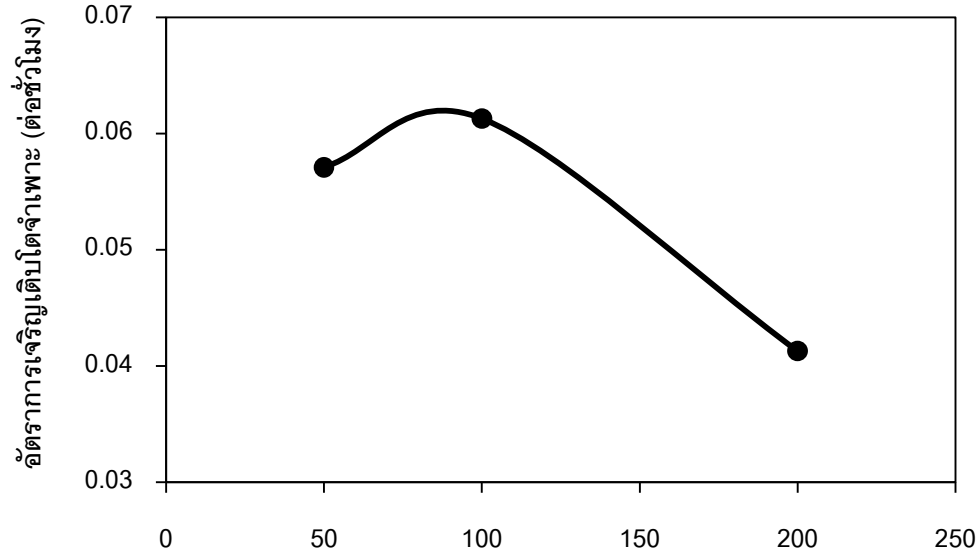
ต่อลิตร มีค่าสูงมากเกินไป ทำให้มีแรงดันออสโมซิสสูง ส่งผลทำให้เชื้อเจริญเติบโตไม่ดี ผลิตเซลล์และไขมันมีค่าน้อยเช่นเดียวกัน

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจลน์ศาสตร์และเปรียบเทียบผล ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.2 พบว่า กระบวนการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 , 100 และ 200 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.057, 0.061 และ 0.041 ชั่วโมง$^{-1}$ ตามลำดับ และมีค่าอัตราการผลิตไขมันจำเพาะเท่ากับ 0.004, 0.008 และ 0.002 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า การใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตรนั้น ให้ค่าทางจลน์ศาสตร์ที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นอื่นๆ

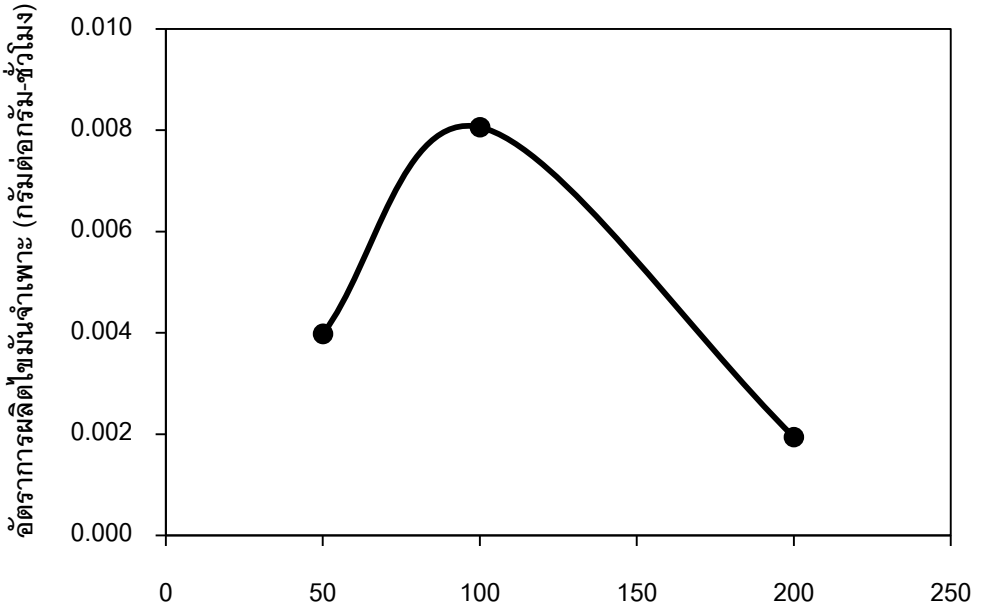
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ในการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆนั้น เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตไขมันได้ในทุกสภาวะ แต่สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ คือ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตดีและผลิตไขมันได้สูงสุด



รูปที่ 4.1 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ(ก) 50 กรัมต่อลิตร (ข) 100 กรัมต่อลิตร (ค) 200 กรัมต่อลิตร



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ (ก) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ข) อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ

ตารางที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส โดยการแปรผันค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์

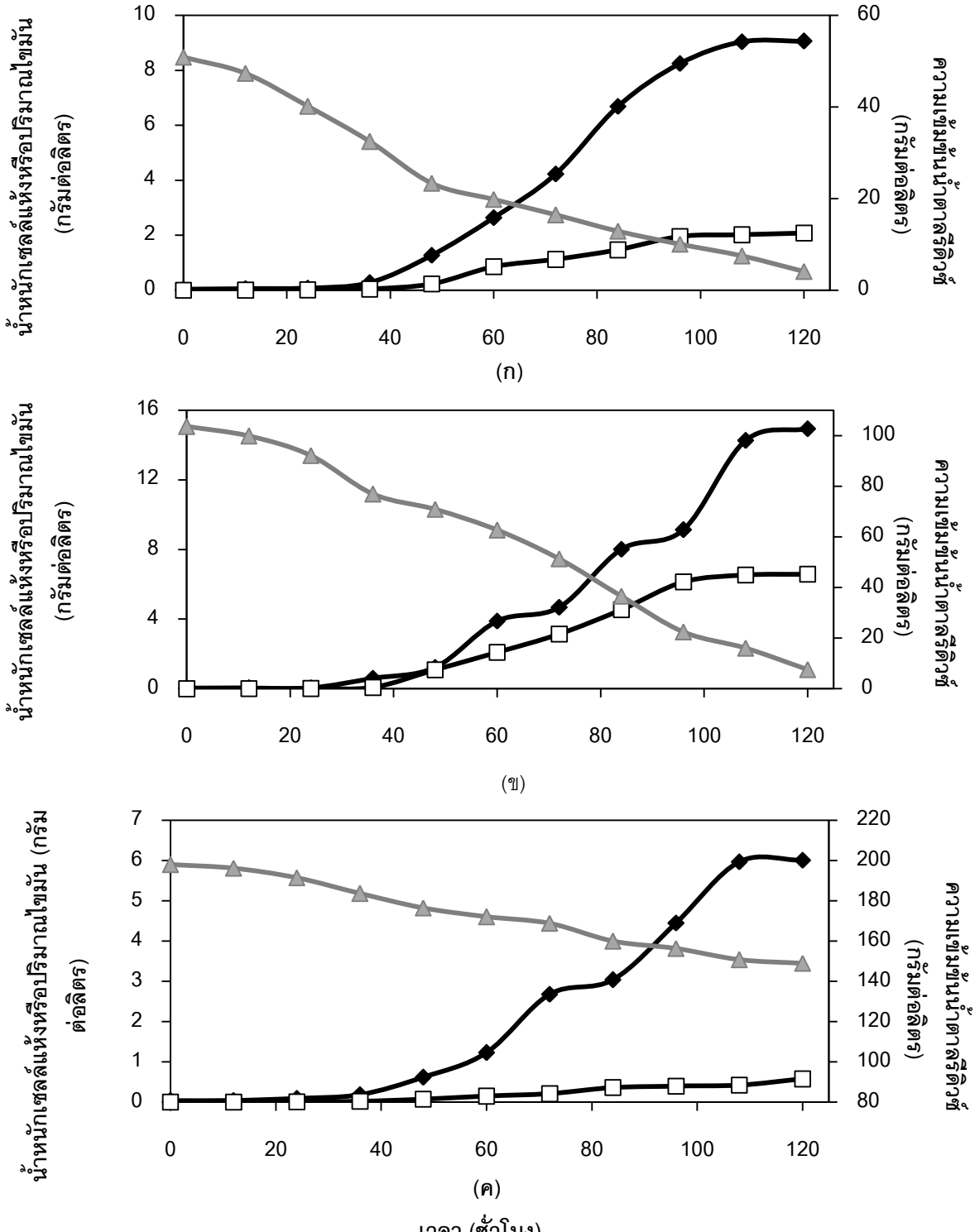
ตัวแปร	**ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)**		
	50	100	200
ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร)	2.897	8.130	0.492
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	50.237	98.973	199.557
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	46.143	93.843	94.880
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	13.880	17.010	2.820
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมน้ำตาล)	6.278	8.663	0.518
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมเซลล์แห้ง)	17.447	47.795	20.872
อัตราการผลิตไขมัน (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.024	0.067	0.004
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.057	0.061	0.041
อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.004	0.008	0.002

4.2.2 ผลการเลี้ยงเชื้อ *Rs.toruloides* ที่ความเข้มข้น น้ำตาลรีดิวซ์ 50, 100 และ 200 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.3 (ก) แสดงผลการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rs.toruloides* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร เชื้อมีการปรับตัวในอาหารในระยะเวลา 36 ชั่วโมง จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 0.280 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจึงเจริญเติบโตแบบทวีคูณ โดยที่ชั่วโมงที่ 48 และ 60 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.270 และ 2.640 กรัมต่อลิตร การเจริญเติบโตจะเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 108 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด 9.060 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยง ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปทั้งหมด คือ 46.749 กรัมต่อลิตร การผลิตไขมันที่ได้นั้นจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มจำนวนเซลล์ หรือ น้ำหนักแห้ง โดยจะมีเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 48 จะได้ปริมาณไขมันสูงสุดที่ 2.083 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 100 กรัมต่อลิตร จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.3 (ข) พบว่า เชื้อมีการปรับตัวได้นานขึ้น ถึง 48 ชั่วโมง ก่อนจะเข้าสู่การเจริญเติบโตแบบทวีคูณ โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ได้คือ 14.940 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 120 และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์อย่างคงที่จนเหลือเพียง 3.953 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตไขมันของเซลล์ จะเริ่มเพิ่มขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 60 ปริมาณไขมันสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 คือ 6.583 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร มีผลทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นและสามารถผลิตไขมันได้เพิ่มขึ้น

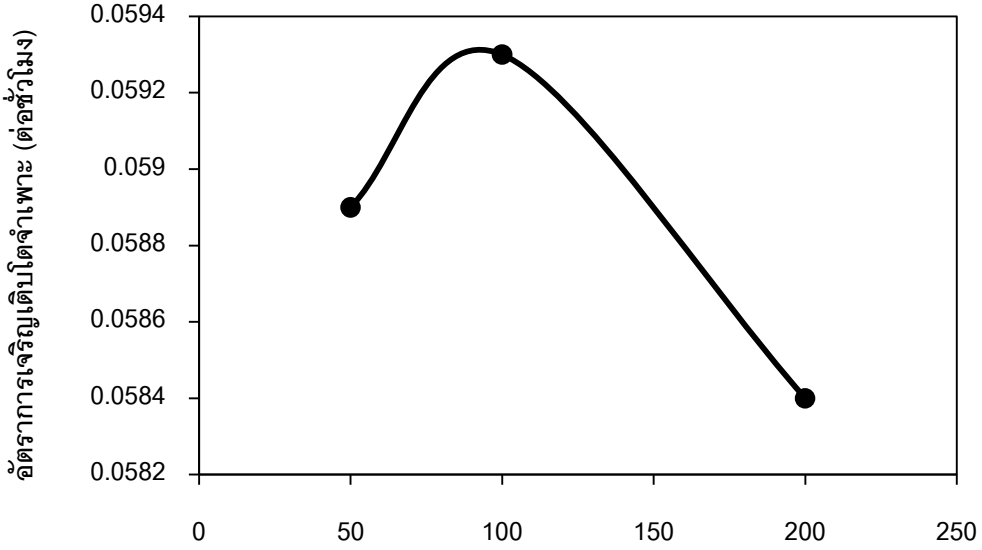
เมื่อใช้อาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 200 กรัมต่อลิตร จะได้ผลดังรูปที่ 4.3 (ค) จะเห็นได้ว่า เชื้อมีระยะการปรับตัวอยู่ที่ 48 ชั่วโมงเช่นกัน ก่อนเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ โดยได้เซลล์สูงสุด เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ เพียง 6.010 กรัมต่อลิตร และการผลิตไขมันของเชื้อนั้นเกิดขึ้นในอัตราที่น้อยมาก เมื่อเทียบกับที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลอื่นๆ เนื่องมาจากความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มากเกินไปนั้น ทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของเชื้อ *Rs.toruloides* ทำให้ได้ปริมาณไขมันสูงสุดเพียง 0.580 กรัมต่อลิตร และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพียง 49.002 กรัมต่อลิตร ทำให้มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในระบบถึง 149.010 กรัมต่อลิตร ถือว่า เชื้อ *Rs. toruloides* ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปเพียงประมาณร้อยละ 25 ของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่านั้น



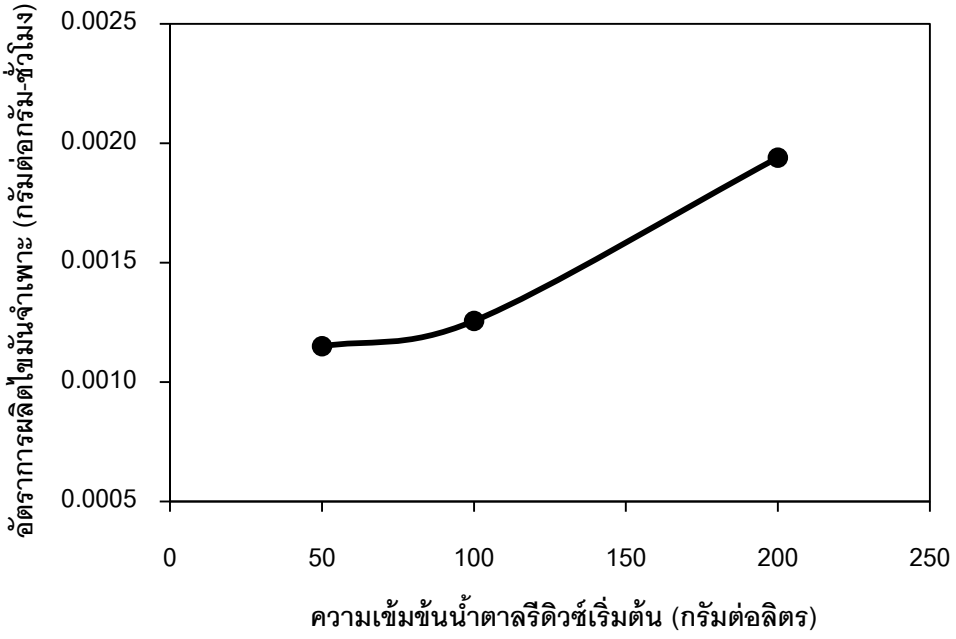
รูปที่ 4.3 ผลการเลี้ยงเชื้อ *Rs.toruloides* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ (ก) 50 กรัมต่อลิตร (ข) 100 กรัมต่อลิตร (ค) 200 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาค่าจลน์ศาสตร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะต่างๆ และเปรียบเทียบผล ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.3 พบว่า เชื้อ *Rs.toruloides* มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเมื่อเจริญเติบโตในความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.056 ชั่วโมง$^{-1}$ และเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 และ 200 กรัมต่อลิตร จะมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.041 และ 0.044 ชั่วโมง$^{-1}$ ในขณะที่อัตราการผลิตไขมันจำเพาะเท่ากับ 0.005, 0.006 และ 0.001 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า อัตราการผลิตไขมันจำเพาะมีค่าใกล้เคียงกันที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 และ 200 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตรนั้น มีค่าร้อยละการผลิตไขมันและค่าอัตราการผลิตที่สูงกว่า

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Rs.toruloides* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ พบว่า *Rs.toruloides* สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกสภาวะ แต่สภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ส่วนสภาวะที่น้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าหรือมากกว่านี้ ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตเพื่อผลิตไขมันได้น้อย



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมัก โดย เชื้อ *Rs.toruloides* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ (ก) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ข) อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ

ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อการเลี้ยงเชื้อ *Rs.toruloides* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส โดยการแปรผันค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์

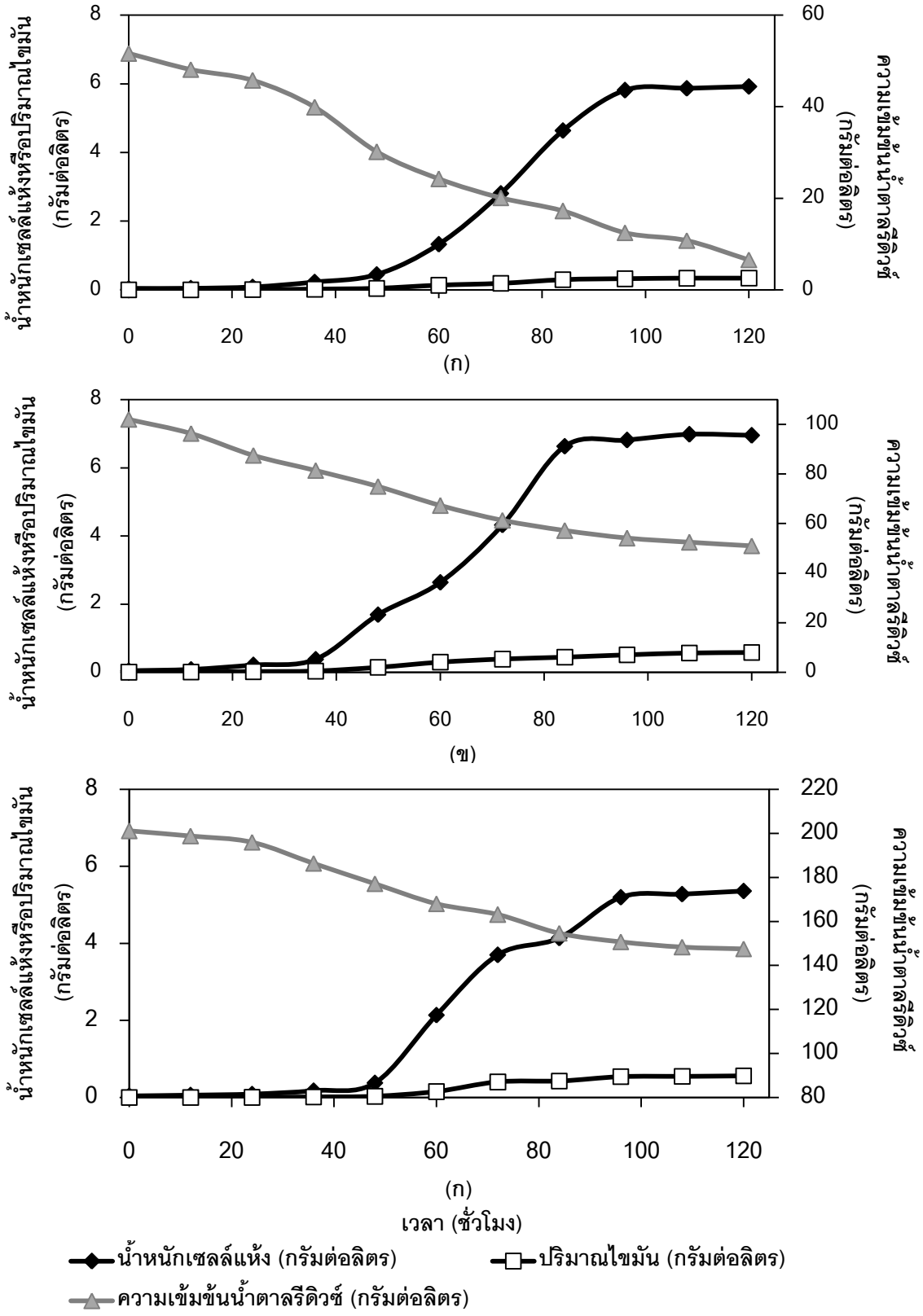
ตัวแปร	**ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)**		
	50	100	200
ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร)	2.083	6.583	0.580
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	50.879	103.587	198.012
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	46.749	96.047	49.002
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	9.060	14.940	6.010
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมน้ำตาล)	4.456	6.854	1.184
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมเซลล์แห้ง)	22.991	44.063	9.651
อัตราการผลิตไขมัน (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.017	0.055	0.005
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.041	0.056	0.044
อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.005	0.006	0.001

4.2.3 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R.graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50, 100 และ 200 กรัมต่อลิตร

สำหรับผลการเลี้ยงเชื้อ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (ก) การเจริญเติบโตของเชื้อมีลักษณะคล้ายกับเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ ช่วงการปรับตัวประมาณ 48 ชั่วโมงและช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณเช่นเดียวกัน ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 เพียง 5.920 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้ออื่นๆ และปริมาณไขมันที่ได้นั้นมีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง หรืออาจกล่าวได้ว่า มีการผลิตน้อยมาก ได้ปริมาณไขมันสูงสุด เพียง 0.345 กรัมต่อลิตร และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพียง 45.033 กรัมต่อลิตร ทำให้มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในระบบ 6.570 กรัมต่อลิตร

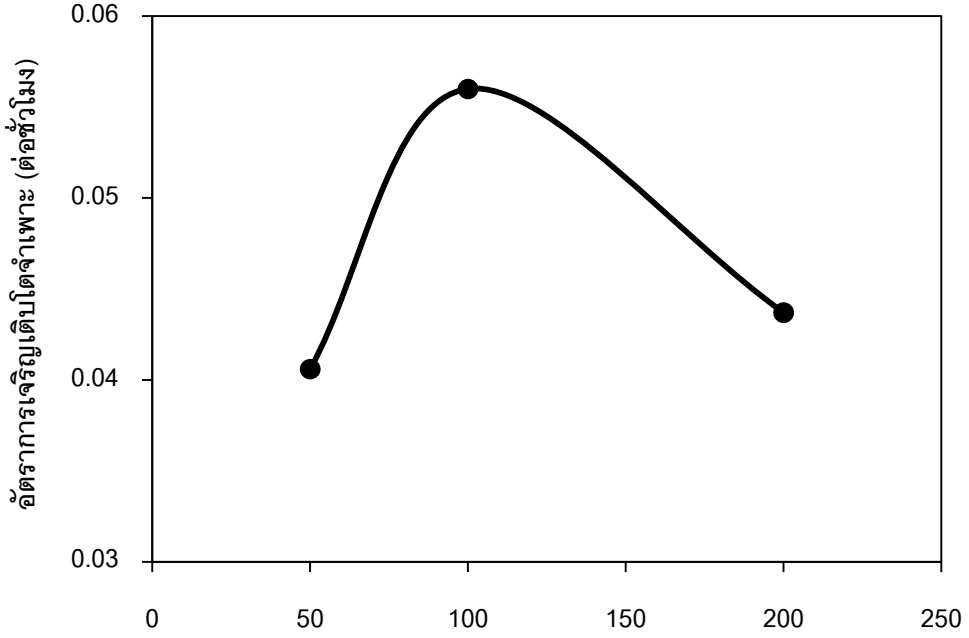
เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 100 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองในรูปที่ 4.5 (ข) ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดอยู่ที่ 6.950 กรัมต่อลิตร และปริมาณไขมันเพียง 0.579 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ และมีการใช้น้ำตาลที่น้อย ทำให้มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เหลือสูงถึง 51.021 กรัมต่อลิตร

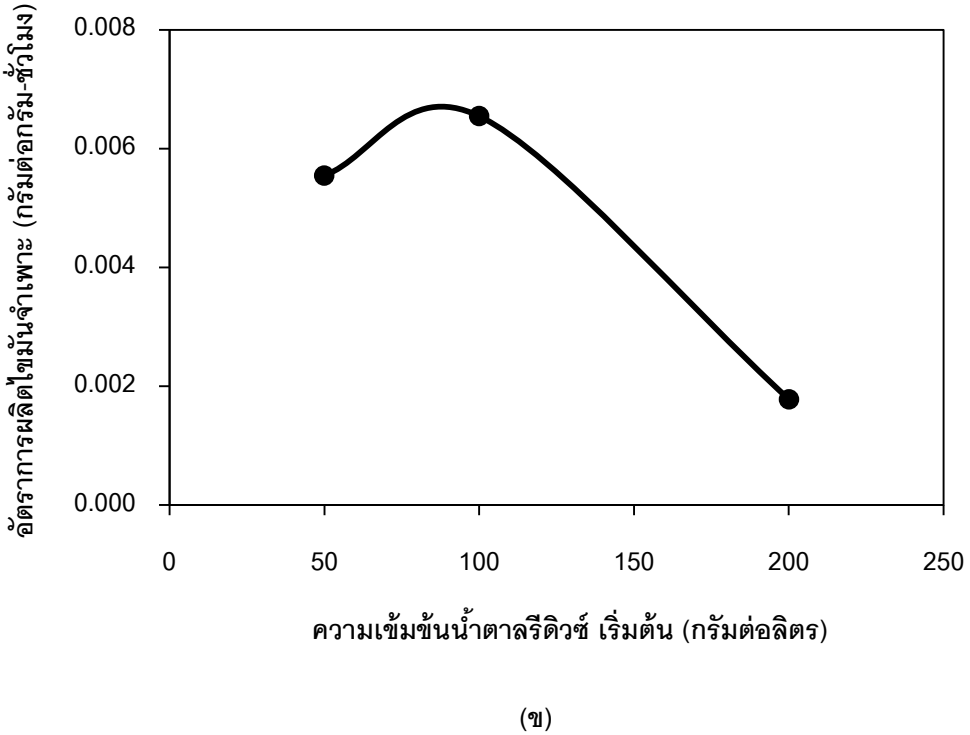
จากรูปที่ 4.5 (ค) แสดงการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 200 กรัมต่อลิตร จะให้เซลล์สูงสุดและปริมาณไขมันสูงสุด เป็น 5.360 และ 0.565 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดได้เพียง 53.581 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.5 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ (ก) 50 กรัมต่อลิตร (ข) 100 กรัมต่อลิตร (ค) 200 กรัมต่อลิตร

สำหรับค่าจลน์ศาสตร์ที่คำนวณได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. graminis* แสดงในรูปที่ 4.6 และตารางที่ 4.4 พบว่า ทั้งค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ , ค่าอัตราการผลิตไขมันจำเพาะ , และอัตราการผลิตไขมันที่ได้จาก 3 สภาวะมีค่าคงที่ คือ มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.059, 0.059 และ 0.058 ชั่วโมง$^{-1}$ ตามลำดับ และมีค่าอัตราการผลิตไขมันจำเพาะเท่ากับ 0.001, 0.001 และ 0.002 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ และมีค่าร้อยละไขมันแตกต่างกันเล็กน้อยคือ 0.766, 1.134 และ 1.054 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาร่วมกับความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ไปจะพบว่าเชื้อจะสามารถใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 45.033-53.581 กรัมต่อลิตร ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ก็ตาม แสดงว่า อาหารที่มีน้ำเชื่อมผลไม้มีความไม่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ จึงส่งผลให้ไม่มีการปรับตัวต่อการใช้อาหารชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเหมือนเชื้อยีสต์ 2 สายพันธุ์แรก





รูปที่ 4.6 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่างๆ (ก) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ข) อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อการเลี้ยงเชื้อเชื้อ *R. graminis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส โดยการแปรผันค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์

ตัวแปร	**ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)**		
	50	100	200
ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร)	0.345	0.579	0.565
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	51.603	102.043	201.121
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	45.033	51.022	53.581
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	5.920	6.950	5.360
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมน้ำตาล)	0.766	1.134	1.054
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมเซลล์แห้ง)	5.775	8.331	10.701
อัตราการผลิตไขมัน (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.003	0.004	0.004
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.059	0.059	0.058
อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.001	0.001	0.002

จากผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ค่าต่างๆโดยปริมาณไขมันที่ได้ในแต่ละเชื้อ เป็นไปดังรูปที่ 4.7 พบว่า เชื้อยีสต์มีการใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเพื่อผลิตไขมันได้เป็นอย่างดี ยกเว้นเชื้อ *R. graminis* โดยลักษณะการผลิตไขมันมีลักษณะเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ คือ ยีสต์มีการอัตราเจริญเติบโตช้า และการสร้างไขมันมีระยะเวลาที่นาน ประมาณ 48-90 ชั่วโมง (Gill และคณะ,1977 ; Boulton and Ratledge 1984 ; Hansson และ Dostalek ,1986; Ykema และคณะ, 1989 ; Jacob ,1992a ; Johnson และคณะ ,1995 ; Jacob และ Krishnamurlhyb ,1990 ; Daniel และคณะ ,1999; Papanikolaou และคณะ ,2001; Papanikolaou และคณะ, 2002;Ratledge ,2004; Li และคณะ ,2005; Li และคณะ ,2007 ; Angerbauer และคณะ,2008 ; Pan et al. 2009)

เมื่อนำข้อมูลของยีสต์ทั้งสามชนิดจากการใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ดีที่สุด เพื่อคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ Yx/s_{max} (สัมประสิทธิ์ของการสร้างเซลล์) Yp/s_{max} (สัมประสิทธิ์ของการสร้างผลิตภัณฑ์) Yp/x_{max} (สัมประสิทธิ์ของการสร้างผลิตภัณฑ์จากเซลล์) ได้ผลการคำนวณดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส

เชื้อยีสต์	**Yx/s_{max} (กรัมต่อกรัม)**	**Yp/s_{max} (กรัมต่อกรัม)**	**Yp/x_{max} (กรัมต่อกรัม)**
R. glutinis	0.181	0.087	0.478
Rs. toruloides	0.156	0.069	0.440
R. graminis	0.136	0.011	0.083

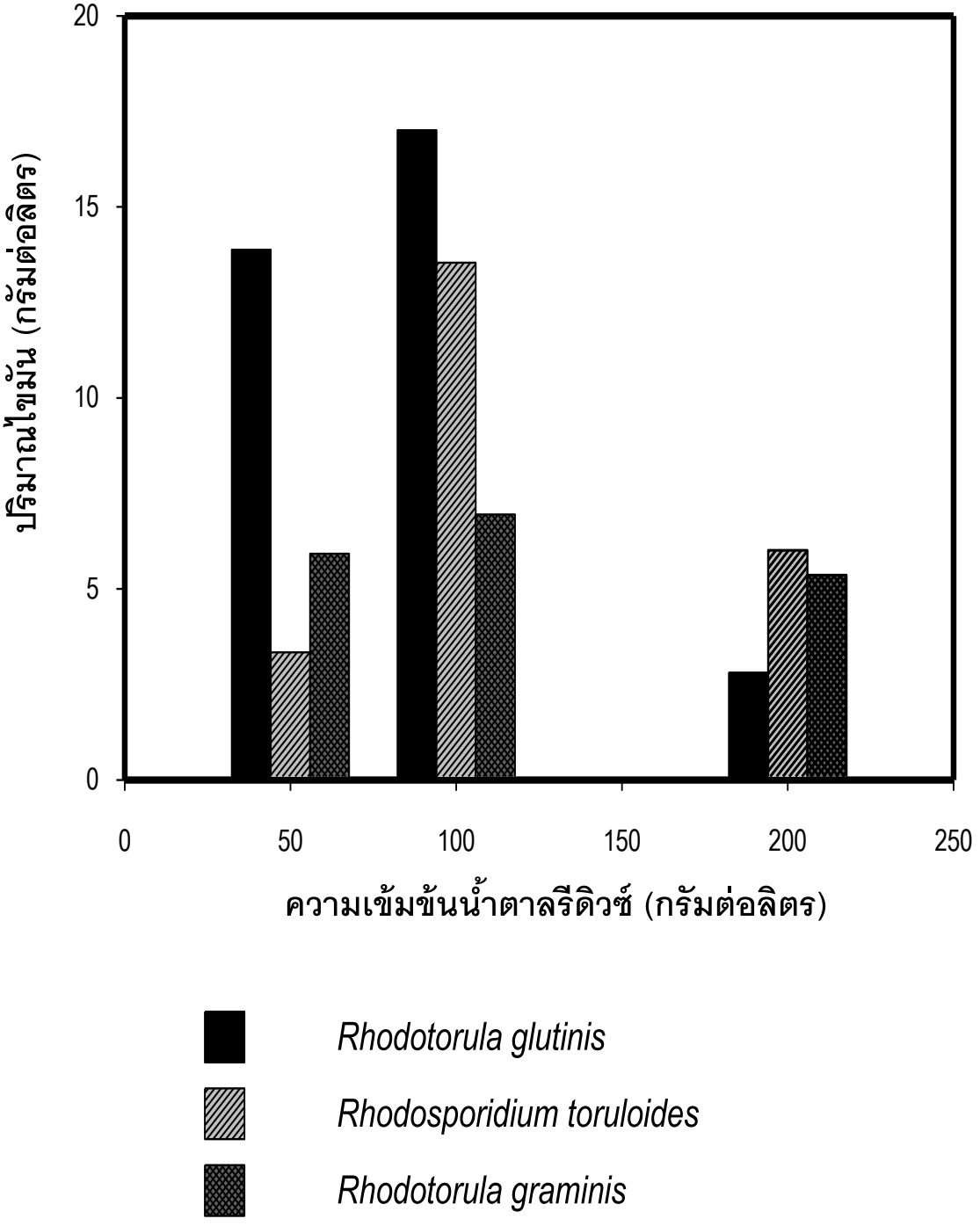
จากตารางที่ 4.5 พบว่าเชื้อยีสต์ทั้งสามชนิดมีค่า Yx/s_{max} มากกว่า Yp/s_{max} แสดงว่าน้ำตาลรีดิวซ์ส่วนใหญ่นำไปใช้ในการผลิตเซลล์มากกว่านำไปใช้ในการผลิตไขมันส่วนค่า Yp/x_{max} เป็นความสามารถในการสร้างไขมันจากตัวเซลล์มีค่าแตกต่างกันตามลักษณะของสายพันธุ์ โดยเชื้อยีสต์ *R. glutinis* มีค่า Yx/s_{max}, ค่า Yp/s_{max} และค่า Yp/x_{max} ที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ แสดงว่า มีการเจริญเติบโตและใช้น้ำตาลรีดิวซ์อย่างมีประสิทธิภาพและ สามารถเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็นเซลล์และไขมันได้มากที่สุด โดยการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็นเซลล์มีค่าเป็น 2.090

เท่าของการเปลี่ยนเป็นไขมัน และเมื่อพิจารณาค่า Yp/x_{max} ที่แสดงถึงการที่เซลล์มีความสามารถในการสร้างไขมันนั้นมีค่ามากที่สุด คือ ประมาณ 1.410 เท่าของ *Rs. toruloides* และ 5.740 เท่าของ *R. Graminis* แสดงว่า เชื้อ *R. glutinis* มีประสิทธิภาพในการสร้างไขมันดีที่สุดเมื่อเทียบกับอีกสองสายพันธุ์

Rs. toruloides มีค่า Yp/s_{max} และ Yp/x_{max} และค่า Yp/x_{max} ที่สูงเป็นอันดับที่สอง แสดงว่า มีการนำน้ำตาลรีดิวซ์ ไปใช้ในการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ แต่ประสิทธิภาพในการนำน้ำตาลรีดิวซ์ ไปสร้างเซลล์และไขมันยังคงมีค่าสูงโดยการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็นเซลล์มีค่าเป็น 2.140 เท่าของการเปลี่ยนเป็นไขมัน รวมทั้งเซลล์มีความสามารถในการสร้างไขมันได้สูงเช่นกัน

R. graminis มีค่า Yx/s_{max} ที่ใกล้เคียงกับค่าของ *Rs. toruloides* แสดงว่า เชื้อยีสต์ชนิดนี้จะนำน้ำตาลรีดิวซ์ ไปใช้ในการสร้างเซลล์ตั้งแต่ที่มีการเริ่มเลี้ยงเชื้อทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้น มีการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเซลล์เกิดได้ดี แต่มีค่า Yp/s_{max} น้อยที่สุด คิดเป็น 12.010 เท่าของการเปลี่ยนเซลล์ เมื่อพิจารณาจากค่า Yp/x_{max} ที่น้อยที่สุด แสดงว่า เชื้อ *R. Graminis* อาจมีการสร้างผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นภายในเซลล์และนอกเซลล์ มากกว่าการสร้างไขมันภายในเซลล์

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมด จึงทำการคัดเลือกเชื้อ *R. glutinis* เพื่อการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.7 ปริมาณไขมันที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis, R. toruloides* และ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50- 200 กรัมต่อลิตร

4.3 ผลการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเบสต่อการผลิตไขมัน

สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไขมัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ คือ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดเบส เป็นต้น ดังนั้นจึงทำการศึกษากระบวนการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 และผลการทดลองที่ได้เป็นไปดังรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.6-4.7

ผลการทดลองกระบวนการผลิตไขมัน เมื่อมีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสที่ 3.0 ดังแสดงในรูปที่ 4.8 (ก) เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของเชื้อ *R. glutinis* พบว่ามีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน จนถึงชั่วโมงที่ 96 ของเลี้ยงเชื้อ อัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จึงเริ่มช้าลง ซึ่งสัมพันธ์กับเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ค่อนข้างคงที่และได้เซลล์สูงสุดเท่ากับ 17.560 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ของการเลี้ยงเชื้อและมีปริมาณไขมันสูงสุด 8.181 กรัมต่อลิตร

สำหรับการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารที่ 4.0 ของเชื้อ *R. glutinis* นั้นเป็นไปดังรูปที่ 4.8 (ข) เซลล์สูงสุดนั้นได้จากชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อและเซลล์สูงสุดที่ได้นั้นมีค่าสูงกว่าที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ค่าความเป็นกรดเบสที่ 3.0 คือ 18.940 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับปริมาณไขมันสูงสุดที่มีค่ามากกว่าคือ 9.537 กรัมต่อลิตร รวมถึง ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีการใช้มากกว่าเล็กน้อยคือ 97.354 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไขมันของเชื้อ *R. glutinis* ในสภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสที่ 5.0 ดังแสดงในรูปที่ 4.8 (ค) เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ส่วนใหญ่ถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยให้รูปแบบการเจริญเติบโตคล้ายกับการทดลองที่ควบคุมค่าความเป็นกรดเบส 3.0 และ 4.0 โดยเชื้อมีการเจริญเติบโตไปจนได้เซลล์สูงสุดเท่ากับ 18.960 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณไขมันสูงสุดคือ 9.070 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณไขมันที่ได้มีค่าน้อยกว่าที่ได้จาก การทดลองที่ค่าความเป็นกรดเบส 3.0 และ 4.0 สำหรับการใช้น้ำตาลรีดิวซ์นั้นมีค่าใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *R. glutinis* ที่การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ค่าความเป็นกรดเบสที่ 3.0 และ 4.0 คือ 95.770กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไขมัน ในสภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารที่ 6.0 ดังแสดงในรูปที่ 4.8 (ง) เมื่อพิจารณารูปแบบการเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีรูปแบบคล้ายกระบวนการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมค่าความเป็นกรดเบส 3.0, 4.0, และ 5.0 มีเซลล์สูงสุดเท่ากับ 17.990 กรัมต่อลิตรและให้ปริมาณไขมันสูงสุดที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อคือ 8.220

กรัมต่อลิตร ซึ่งทั้งเซลล์และปริมาณไขมันที่ได้นั้นมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับที่สภาวะค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นค่าอื่น

จากรูปที่ 4.9 เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ จะเห็นได้ว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ส่วนใหญ่จะมีช่วงการเจริญเติบโตในช่วงค่าความเป็นกรดเบสที่กว้างเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย จากการวิจัยของ Enode (1946) ได้รายงานว่าค่าความเป็นกรดเบสจัดเป็นปัจจัยที่สอง ที่มีผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโต นอกจากนี้ Hauer และ Hofer (1978) ได้รายงานถึงความสำคัญของค่าความเป็นกรดเบสว่า การนำไอออนต่างๆ และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวผ่านเข้าสู่เซลล์นั้น ต้องอาศัยพลังงานความต่างศักย์ระหว่างผิวด้านในและด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมาผลมาจากค่าความเป็นกรดเบสที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นแรงดันให้ไอออนเหล่านี้เคลื่อนเข้าสู่เซลล์ อย่างไรก็ตามผลของความเร็วในการนำอาหารเข้าสู่เซลล์ก็ยังมีอิทธิพลไม่มากนักต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ดังนั้นความเป็นกรดเบสที่ใช้ในการทดลองจึงทำให้มีค่าการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตไขมัน จะมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด โดยอัตราการผลิตไขมันจะมีค่าลดลงถึงร้อยละ 13.338 เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเปลี่ยนจาก 4.0 เป็น 6.0 แสดงให้เห็นว่า การผลิตไขมันของเซลล์ยีสต์มีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสมากกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงค่าความต่างศักย์ส่งผลต่อการนำน้ำตาลและไอออนต่างๆผ่านเยื่อเซลล์เพื่อไปสู่วิถีของการผลิตไขมัน

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังตารางที่ 4.6 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดเบสที่ 4.0 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเชื้อ *R. glutinis* โดยให้ค่าการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ เป็นไขมันและการสร้างไขมันต่อหน่วยเซลล์มีประสิทธิภาพสูงที่สุด (ค่า Yp/s_{max} และค่า Yp/x_{max} มีค่ามากที่สุด)

ที่ค่าความเป็นกรดเบสต่ำๆ ที่ 3.0 ยีสต์มีการเจริญต่ำ ทำให้ค่า Yx/s_{max} มีค่าน้อย รวมทั้งมีการผลิตไขมันน้อยที่สุด (ค่า Yp/s_{max} และค่า Yp/x_{max} มีค่าน้อยที่สุด) เมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆ โดยเมื่อดูผลการทดลองพบว่า การสร้างชีวมวลลดลง และร้อยละการสร้างไขมันลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ พบว่า ยีสต์ *Rhodotorula sp.* (Kessell, 1968) และสายพันธุ์อื่นๆ มีการลดลงของชีวมวลและไขมันในเซลล์ที่ค่าความเป็นกรดเบส 3.0 เช่นกัน (Dyaltlovitskay,1969 ; Hall and Ratledge,1977)

เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดเบส (ความเป็นกรดเบส 5.0 และ 6.0) เมื่อพิจารณาการสร้างไขมันจะพบว่า การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสส่งผลต่อการเปลี่ยน น้ำตาลรีดิวซ์ เป็นไขมัน

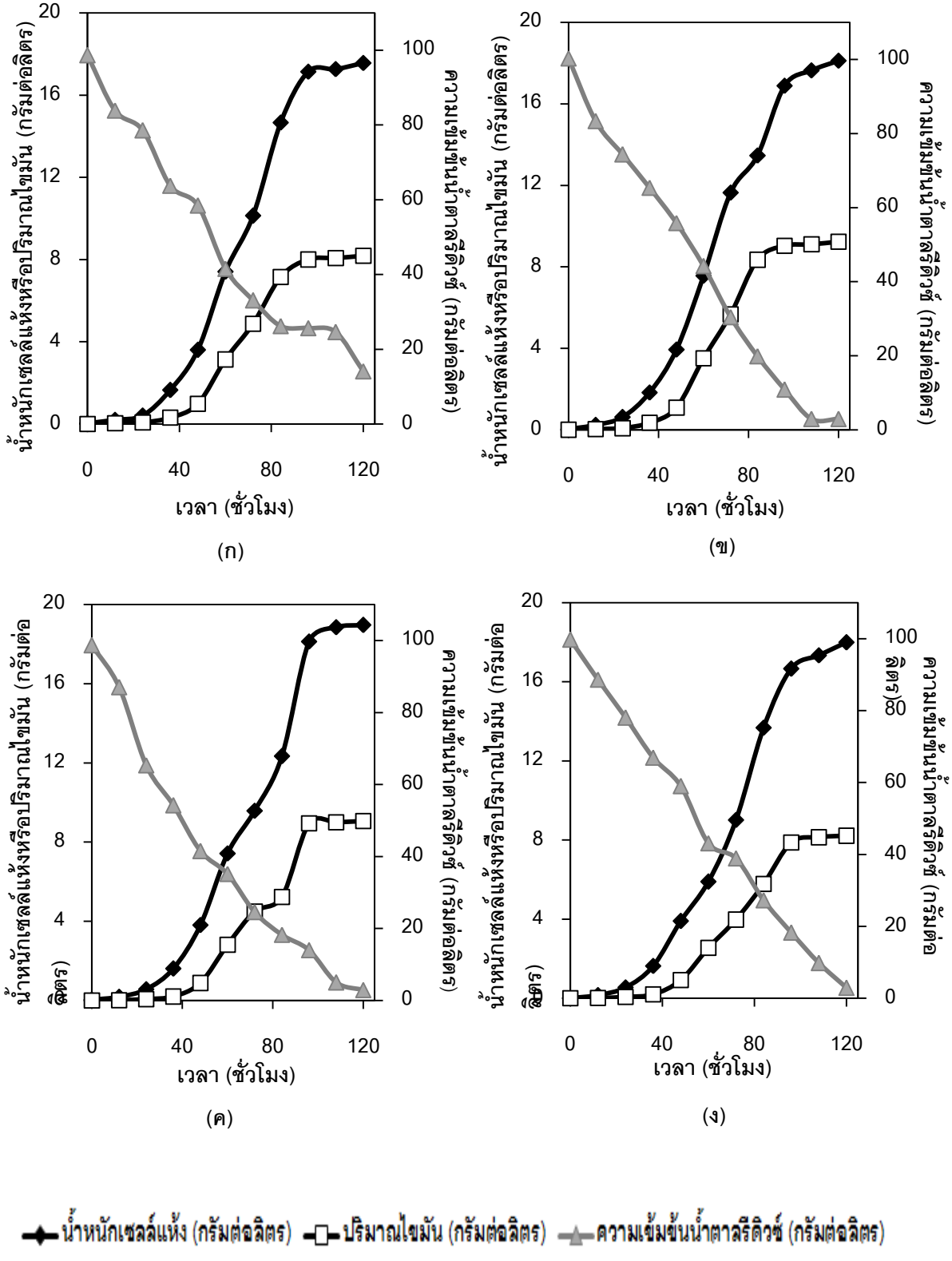
และการสร้างไขมันต่อหน่วยเซลล์อย่างเด่นชัด ดังนั้นค่าความเป็นกรดเบสจัดเป็นปัจจัยสำคัญของการผลิตไขมันในยีสต์ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 4.6 ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบส

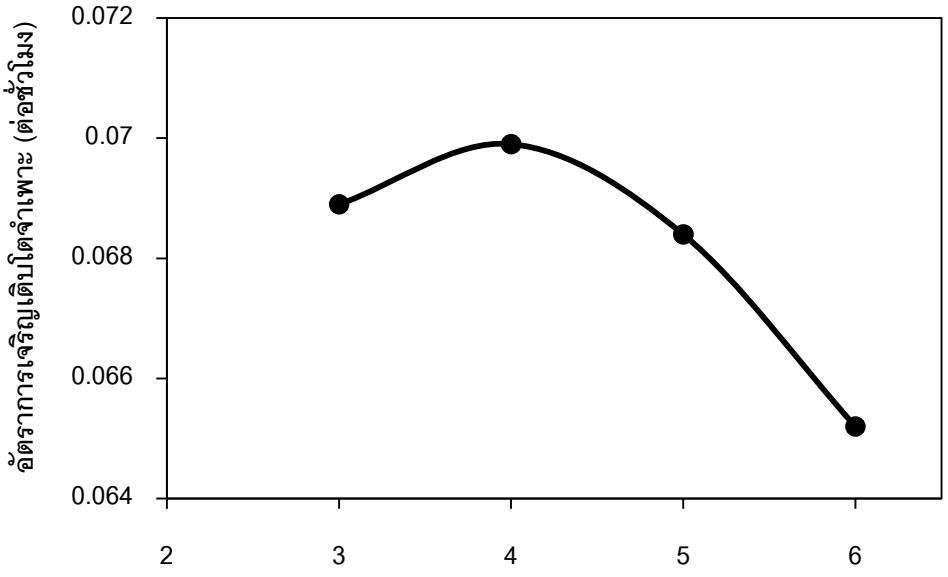
ค่าความเป็นกรดเบส	Yx/s_{max} **(กรัมต่อกรัม)**	Yp/s_{max} **(กรัมต่อกรัม)**	Yp/x_{max} **(กรัมต่อกรัม)**
3.0	0.208	0.072	0.466
4.0	0.186	0.098	0.510
5.0	0.198	0.095	0.478
6.0	0.186	0.085	0.457

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหารนั้นมีผลต่อการผลิตไขมันของเชื้อ *R. Glutinis* โดยเชื้อ *R. Glutinis* นั้นสามารถเจริญเติบโตและผลิตไขมันได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดคือที่ 4.0 เนื่องจากได้ปริมาณไขมันที่สูงที่สุด อย่างไรก็ตามหากอยู่ในสภาพที่เป็นกรดที่เข้มข้นขึ้น คือ ที่ค่าความเป็นกรดเบส 3.0 นั้นประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและผลิตไขมันจะลดลง อาจเนื่องมาจากค่าความเป็นกรดเบสที่ต่ำเกินไป มีผลยับยั้งต่อกระบวนการในการเจริญเติบโตของเชื้อ ส่งผลให้ปริมาณไขมันที่ได้น้อยลง ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับ Johnson และคณะ (1992) ที่ทำการทดลองเชื้อชนิดเดียวกันนี้ในสภาวะจำกัดไนโตรเจน และทำการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสในช่วง 3.0 - 6.0 เช่นเดียวกัน โดยค่าต่างๆที่ได้จากการทดลองนั้น สรุปดังตารางที่ 4.7

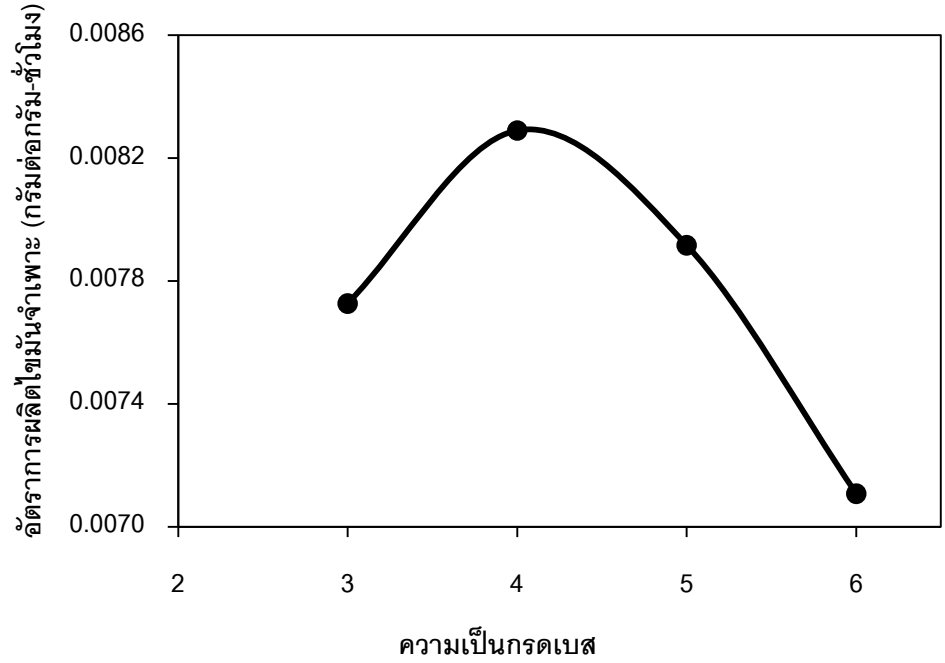
จากการทดลองที่ผ่านมานี้ จึงสามารถสรุปได้ว่า ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องคือ 4.0 ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะที่ได้นี้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.8 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดเบสต่างๆ (ก) ที่ 3.0 (ข) ที่ 4.0 (ค)ที่ 5.0 (ง) ที่ 6.0



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.9 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นของอาหาร 3.0- 6.0 (ก) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ข) อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ

ตารางที่ 4.7 ผลของค่าความเป็นกรดเบสต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องโดยการแปรผันค่าความเป็นกรดเบส

ตัวแปร	ค่าความเป็นกรดเบส			
	3	4	5	6
ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร)	8.181	9.537	9.070	8.220
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	98.677	100.264	99.735	98.677
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	84.603	97.354	95.770	96.825
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	17.560	18.120	18.960	17.990
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมน้ำตาล)	9.670	9.800	9.471	8.490
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมเซลล์แห้ง)	46.587	50.977	47.839	45.692
อัตราการผลิตไขมัน (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.069	0.079	0.076	0.069
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.069	0.070	0.068	0.065
อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.007	0.008	0.007	0.007

4.4 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไขมัน

อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ซึ่งยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้จะเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิในช่วงกว้าง แต่ยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะมีอุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้ดีที่สุดแตกต่างกันไปตามกระบวนการชีวเคมีของแต่ละสายพันธุ์ สำหรับผลการศึกษาถึงผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและผลิตไขมันของเชื้อยีสต์ *R. glutinis* โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.0 โดยการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20, 28, 35 และ 40 องศาเซลเซียสนั้นเป็นไปดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.8-4.9

ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.0 โดยการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แสดงในรูปที่ 4.10 (ก) ให้เซลล์สูงสุดที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 18.890 กรัมต่อลิตร การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในระบบส่วนใหญ่ค่อนข้างคงที่ ยกเว้นในชั่วโมงที่ 72-84 ของการเลี้ยงเชื้อจะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 20.910 กรัมต่อลิตร ซึ่งก็สอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ปริมาณไขมันสูงสุดที่ได้คือ 9.450 กรัมต่อลิตร ได้ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งปริมาณไขมันที่ได้จากผลการทดลองนี้ มีค่าน้อยกว่าปริมาณไขมันที่ได้จากผลการเลี้ยงเชื้อโดยการแปรผันค่าความเป็นกรดเบสแสดงว่าอุณหภูมินั้นส่งผลต่อการผลิตไขมันของเซลล์

เชื้อยีสต์ *R. glutinis* สามารถเจริญเติบโตได้และผลิตไขมันได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยจากรูปที่ 4.10 (ข) จะเห็นได้ว่าลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อนั้น มีระยะเวลาการปรับตัวที่สั้นลงคือที่ 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ และการเจริญเติบโตจะเริ่มคงที่ที่ชั่วโมงที่ 84 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้เซลล์สูงสุดที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 19.690 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันสูงสุดที่ได้เท่ากับ 11.970 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 48.496 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งก็มีค่าสูงที่สุดจากการทดลองที่ผ่านมาเช่นกัน ในขณะที่การหมักที่ 35 และ 40 องศาเซลเซียสนั้นให้เซลล์สูงที่สุดคือ 20.810 และ 22.183 กรัมต่อลิตรและปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 7.910 และ 8.115 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาถึงค่าจลน์ศาสตร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อดังแสดงในตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.11 พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสให้ค่า อัตราการผลิตไขมันจำเพาะและ ค่าอัตราการผลิตไขมันที่สูงที่สุดคือ 0.010 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง และ 0.009 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง โดยจากค่าที่ได้นั้น แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิมีผลต่อความเร็วในการผลิตไขมันเนื่องจากการ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิอื่นๆนั้น มีค่าอัตราการผลิตไขมันลดลงถึงร้อยละ 20 – 35 จากค่าสูงสุด และพบว่าเชื้อยีสต์มีอัตราการจริญเติบโตจำเพาะใกล้เคียงกัน

ส่วนค่าพารามิเตอร์ของสัมประสิทธิ์ต่างๆ ในตารางที่ 4.9 พบว่า ค่า $Y_{x/s}$ $_{max}$ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง แสดงว่า เชื้อ *R. glutinis* สามารถเจริญเติบโตในช่วงกว้างของการทดลองได้ และมีการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็นเซลล์มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อพิจารณาค่า $Y_{p/s}$ $_{max}$ และ $Y_{p/x}$ $_{max}$ พบว่า เชื้อมีการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์และเซลล์เป็นไขมันได้เพิ่มขึ้นจากที่อุณหภูมิ 20 ถึง 28 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปจนถึง 40 องศาเซลเซียส ค่า $Y_{p/s}$ $_{max}$ และ $Y_{p/x}$ $_{max}$ มีค่าลดลง แสดงว่าเชื้อมีการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็นไขมันและประสิทธิภาพการสร้างไขมันลดลง

Ma และคณะ (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้สำหรับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ประกอบไปด้วยช่วง lag, exponential และ stationary จะเกิดได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์ส่วนใหญ่อาจตาย ซึ่งจะชักนำให้เกิดการหมักที่ช้าลงในช่วงท้าย ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้สรุปว่าการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักจะลดความสามารถของเชื้อยีสต์ลง (Ough C.S.,1966) สาเหตุเนื่องมาจากมีการสะสมสารพิษบางชนิดในเซลล์ของเชื้อยีสต์เมื่อมีอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้เซลล์เป็นพิษ (Nagodawithana และคณะ, 1974)

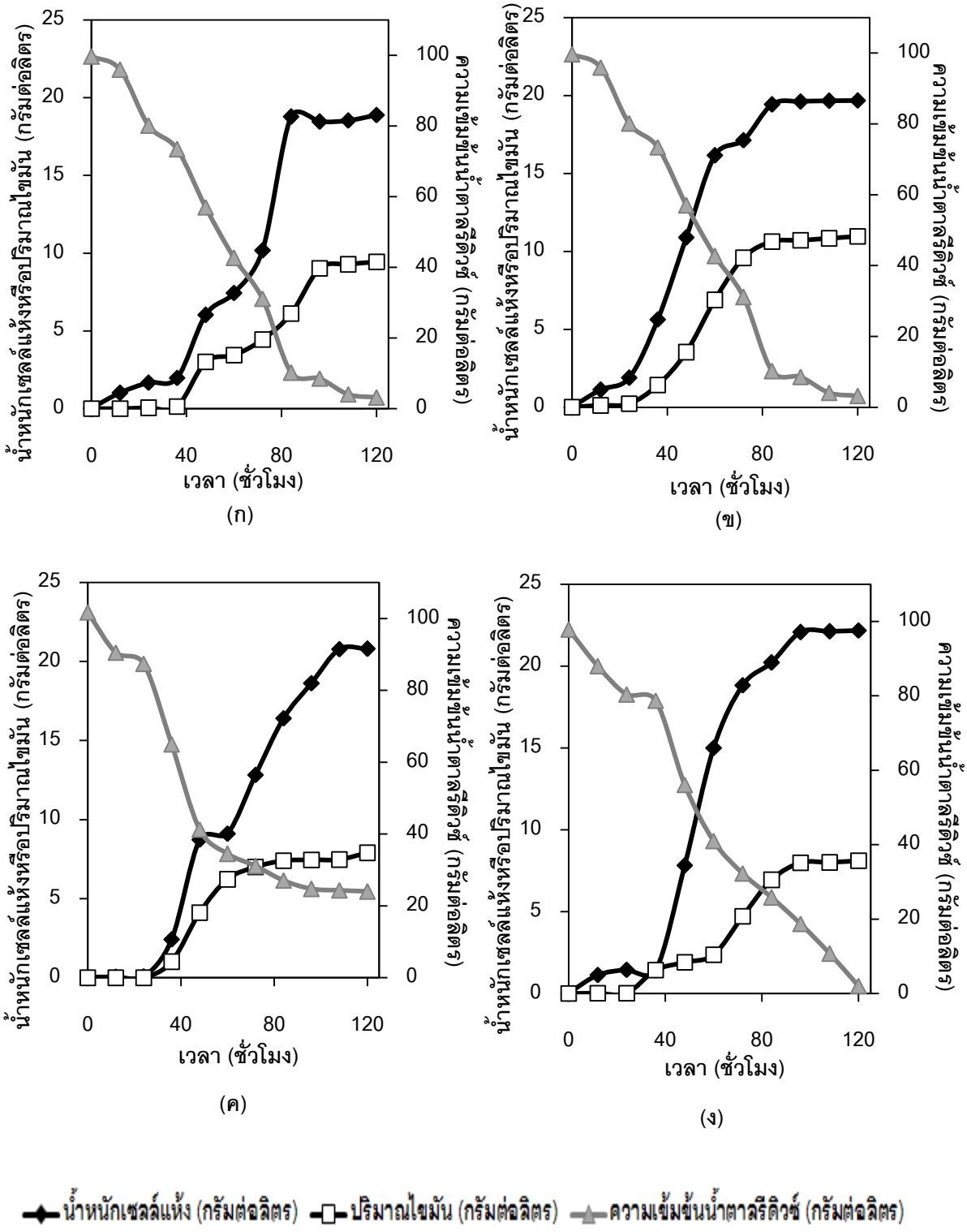
Silinger และคณะ (1982) รวมถึง Du Preez และคณะ (1984) กล่าวว่าที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ให้เป็นไขมัน ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ผลที่ได้เป็นไปในทางเดียวกับคำกล่าวที่ว่าไว้

ตารางที่ 4.8 ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 โดยแปรผันค่าอุณหภูมิ

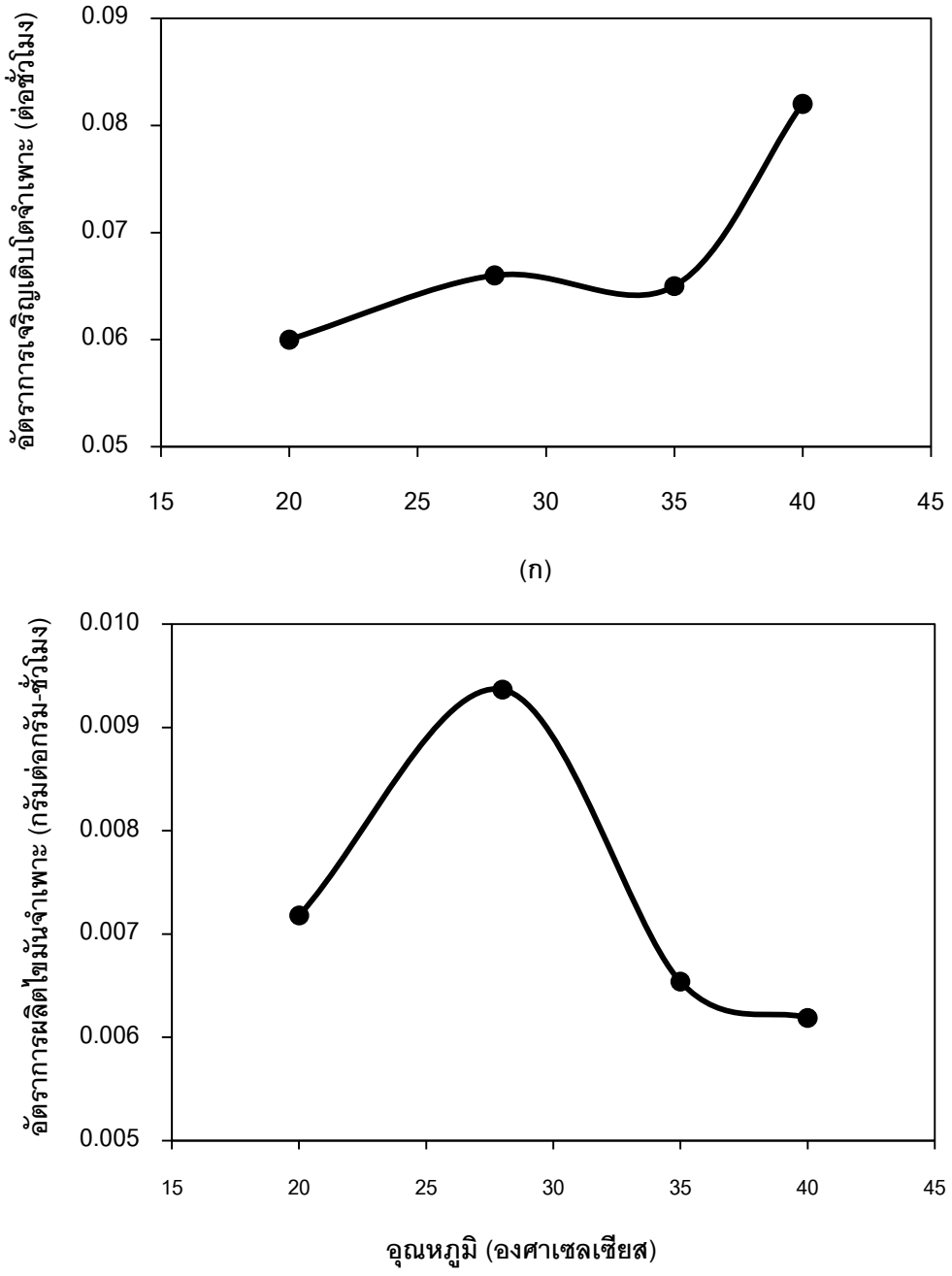
อุณหภูมิ	**$Y_{x/s}$ $_{max}$ (กรัมต่อกรัม)**	**$Y_{p/s}$ $_{max}$ (กรัมต่อกรัม)**	**$Y_{p/x}$ $_{max}$ (กรัมต่อกรัม)**
20	0.197	0.099	0.500
28	0.199	0.121	0.557
35	0.268	0.102	0.380
40	0.261	0.096	0.366

อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับผลการทดลองของ Johnson และ คณะ (1994) ที่เลี้ยงยีสต์ชนิดเดียวกันนี้ในอาหารเหลวกลูโคส ในสภาวะจำกัดไนโตรเจน โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเชื้อจะมีการสะสมเออร์กอสเตรอลซึ่งเป็นไขมันชนิดหนึ่งได้สูงที่สุด นอกจากนี้งานวิจัยของบำเพ็ญ นิ่มเขียน (2002) ได้รายงานว่า ที่อุณหภูมิสูงๆนั้น ยีสต์จะมีการผลิตเซลล์มากกว่าการสร้างไขมัน เมื่อพิจารณาผลผลการทดลองของงานวิจัยนี้ที่ สรุปในดังตารางที่ 4.8 จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียสนั้น มีการผลิตเซลล์ที่มากกว่าการ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิอื่นๆ แต่การผลิตไขมันกลับมีน้อยกว่า

จากผลการทดลองการ เลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* โดยความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตรและค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.0 ที่อุณหภูมิ 20, 28, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาถึงปริมาณไขมันที่ได้และค่าทางจลน์ศาสตร์ พบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสนั้นเหมาะสมต่อการผลิตไขมันของเชื้อชนิดนี้ จึงเลือกอุณหภูมินี้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.10 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และที่อุณหภูมิค่าต่างๆ (ก) 20 องศาเซลเซียส (ข) 28 องศาเซลเซียส (ค) 35 องศาเซลเซียส (ง) 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.11 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และที่อุณหภูมิ 20- 40 องศาเซลเซียส (ก) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ข) อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ

ตารางที่ 4.9 ผลของอุณหภูมิต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 โดยการแปรผันอุณหภูมิ

ตัวแปร	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	20	28	35	40
ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร)	9.450	11.970	7.910	8.115
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	99.670	99.820	101.720	98.772
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	95.800	98.850	77.710	84.930
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	18.890	19.690	20.810	22.183
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมน้ำตาล)	9.864	12.109	10.179	9.554
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมเซลล์แห้ง)	50.026	55.714	38.011	36.582
อัตราการผลิตไขมัน (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.079	0.100	0.066	0.068
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.060	0.065	0.066	0.082
อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.007	0.009	0.006	0.006

4.5 ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตไขมัน

ความเข้มข้นไนโตรเจนในแหล่งอาหารเป็นตัวแปรที่สำคัญในการเพิ่มปริมาณการผลิตไขมันของเซลล์ เนื่องจากในการเจริญเติบโตนั้นเซลล์จำเป็นจำต้องใช้ไนโตรเจนซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนในการเพิ่มจำนวน เมื่อแหล่งไนโตรเจนหมดไป ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดไนโตรเจน จะส่งผลให้เซลล์มีการนำคาร์บอนที่มีอยู่ในแหล่งอาหาร มาใช้โดยตรงเพื่อการสังเคราะห์ไขมันสะสมไว้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ต่อไป ดังนั้นหากอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในแหล่งอาหารมีค่าสูง ก็จะทำให้เชื้อเข้าสู่สภาวะการสังเคราะห์ไขมันได้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามหากอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่สูงเกินไป อาจจะทำให้ปริมาณไขมันที่ได้มีค่าน้อย เนื่องจากสภาวะที่ปริมาณไนโตรเจนหมดไปนั้น อาจมีจำนวนเซลล์ที่สามารถผลิตไขมันได้ในจำนวนน้อย ทำให้ไขมันที่ได้มีค่าน้อย

เมื่อทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *R.glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยแปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 10 - 40 กรัมต่อลิตร แสดงผลดังรูปที่ 4.12 และตารางที่ 4.10-4.11

ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 133:1 แสดงดังรูปที่ 4.12 (ก) เซลล์สูงสุดที่ได้มีค่าไม่สูงมากนัก ส่งผลให้ปริมาณไขมันที่ได้นั้นมีค่าน้อยเช่นเดียวกัน อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต่ำเกินไป หรืออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่สูงเกินไปทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้น้อย ทำให้ได้น้ำหนักเซลล์และปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 16.470 และ 9.256 กรัมต่อลิตร รวมทั้งมีการใช้ น้ำตาลรีดิวซ์ในระบบไป 97.326 กรัมต่อลิตร

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตในแหล่งอาหารเป็น 20 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 80: 1 ผลการทดลองที่ได้เป็นดังรูปที่ 4.12 (ข) ปริมาณไขมันสูงสุดได้เท่ากับ 9.452 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์สูงสุด 15.990 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปเท่ากับ 95.721 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร หรือ คิดเป็นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 57: 1 แสดงผลในรูปที่ 4.12 (ค) มีน้ำหนักเซลล์สูงสุดเท่ากับ 18.440 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามากขึ้น เนื่องมาจากมีความเข้มข้นของเซลล์ที่มากขึ้น และให้ปริมาณไขมันสูงสุด 10.040 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นไนโตรเจนหรือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้น ส่งผลต่อการผลิตไขมันของเชื้อ *R. glutinis* โดยเชื้อสามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุดเมื่อมีความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร หรือที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45:1

เนื่องจาก ที่สภาวะการหมักนี้ ให้ปริมาณไขมันและน้ำหนักเซลล์สูงสุดคือ 12.910 และ 21.940 กรัมต่อลิตร รวมถึงมีการใช้ น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญเติบโตของเซลล์มากที่สุดเช่นกัน คือ 97.860 กรัมต่อลิตร แต่ระยะการปรับตัวของเซลล์เท่ากับ 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าที่การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตอื่นๆ จึงอาจกล่าวได้ว่า เชื้อสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะอาหารนี้ได้อย่างรวดเร็ว

สำหรับค่าทางจลน์ศาสตร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยแปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตในแหล่งอาหารนั้นแสดงไว้ดังรูปที่ 4.13 และตารางที่ 4.11 พบว่า การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร นั้น ให้ค่า อัตราการผลิตไขมันที่สูงที่สุดคือ 0.108 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และ ยังให้ค่าอัตราการผลิตไขมันจำเพาะและค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงที่สุดอีกด้วยคือ 0.008 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง และ 0.078 ต่อชั่วโมงตามลำดับ

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ ต่างๆ ดังตารางที่ 4.10 พบว่า ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45:1 เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเชื้อ *R. glutinis* โดยให้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สูงที่สุด

ประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการสร้างเซลล์นั้น มีค่าลดลงเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นหรือความเข้มข้นไนโตรเจนน้อยลง ซึ่งก็สอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่ได้ เนื่องจากความเข้มข้นไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตไขมันและการผลิตเซลล์ โดยค่า Yx/s_{max} มีค่าลดลงร้อยละ 14.732-26.786 ของค่าสูงสุด เมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ค่า Yp/s_{max} และค่า Yp/x_{max} มีแนวโน้มลดลงเมื่อ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าจำนวนเซลล์นั้นส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์เป็นไขมันและการสร้างไขมันภายในเซลล์เช่นกัน

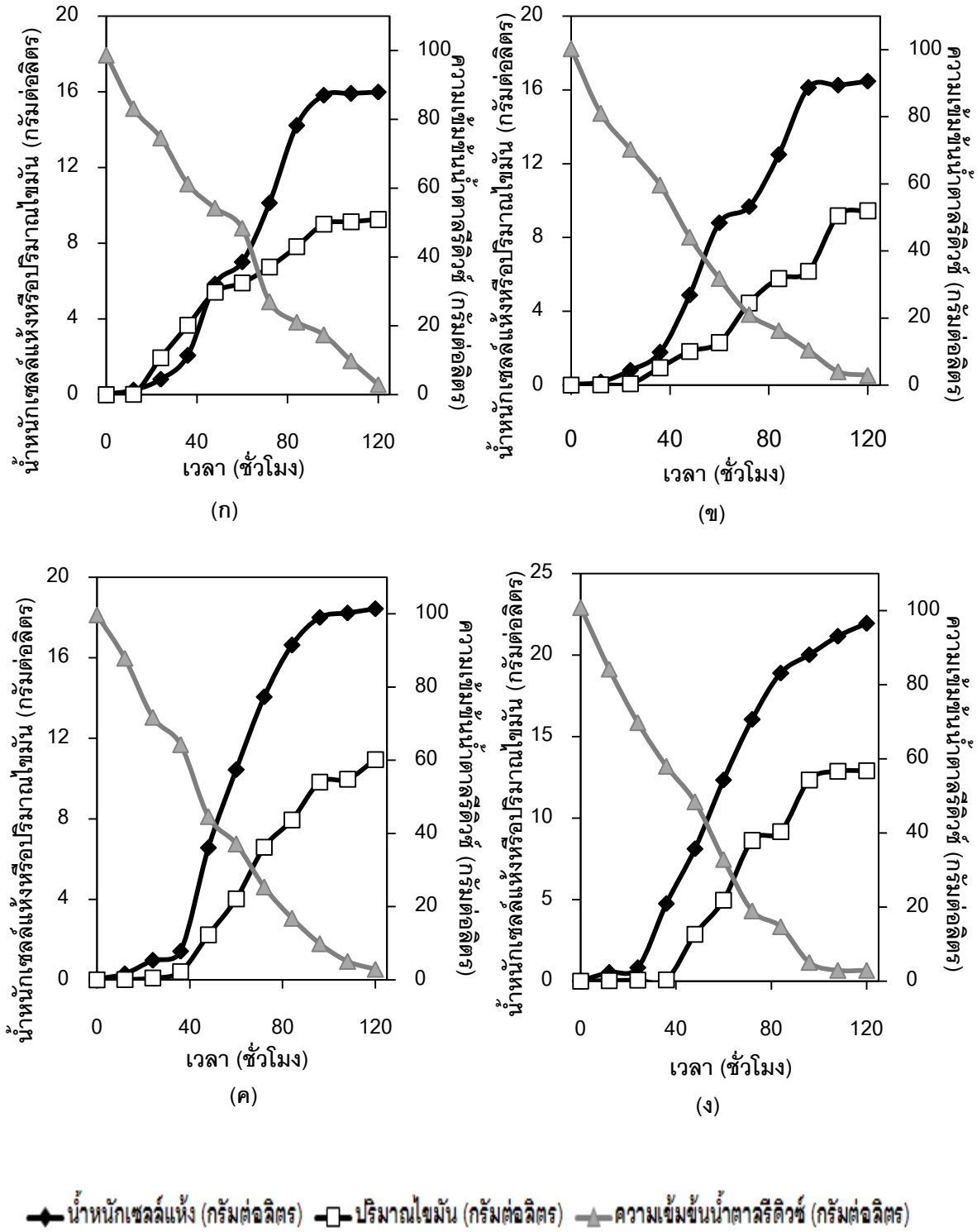
ตารางที่ 4.10 ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยแปรผันค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตเจน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	Yx/s_{max} **(กรัมต่อกรัม)**	Yp/s_{max} **(กรัมต่อกรัม)**	Yp/x_{max} **(กรัมต่อกรัม)**
45	0.224	0.132	0.610
57	0.191	0.103	0.593
80	0.172	0.099	0.574
133	0.164	0.095	0.579

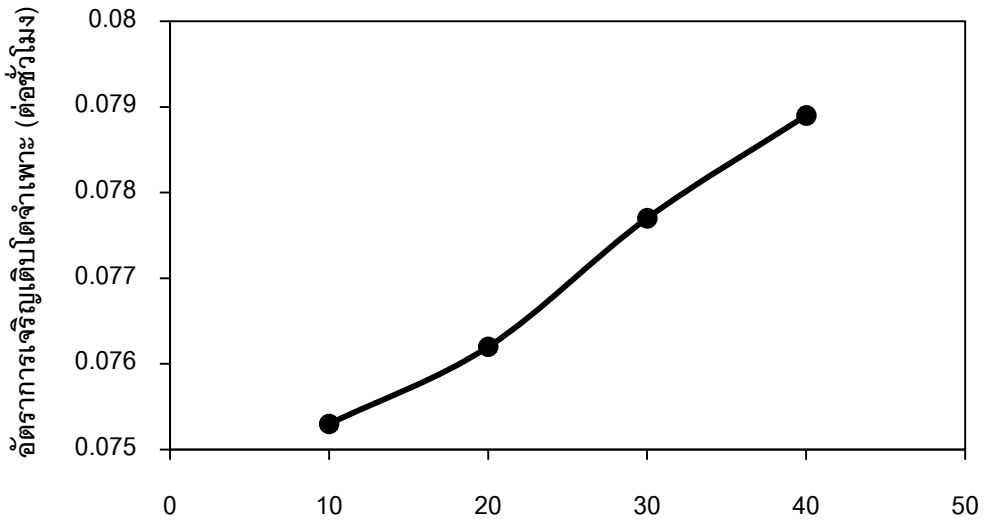
จากผลการทดลองอิทธิพลของ ความเข้มข้น ไนโตรเจน ในงานวิจัยนี้ มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Yoon และคณะ (1982) ที่ทดลองเลี้ยงเชื้อ *R.gracilis* พบว่า มีการผลิตไขมันสูงที่สุด เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 41:1 โดยให้ปริมาณไขมันร้อยละ 39-63 โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนงานวิจัยของอัจฉราวรรณ ทองมี (2530) ที่ทำการทดลองเชื้อ *R.gracilis* ได้ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 34.20 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 75:1

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตเจนนั้นส่งผลกระทบโดยตรงต่อการผลิตไขมัน เนื่องจากการผลิตไขมันจะเกิดขึ้นในสภาวะที่ความเข้มข้นไนโตรเจนในอาหารต่ำหรือหมดไปในขณะที่ความเข้มข้นคาร์บอนยังเหลืออยู่ เมื่อแหล่งไนโตรเจนหมดไป จะทำให้เกิดการลดลงของเอนไซม์ AMP ส่งผลทำให้ความเข้มข้นเอนไซม์ไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งถูกควบคุมด้วยความเข้มข้น AMP มีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของซิเตรตภายในไมโทรคอนเดรียมีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน เซลล์จึงทำการขับซิเตรตภายในไมโทคอนเดรียออกสู่ไซโตพลาสซึม ซึ่งจะถูกแปลงสภาพให้กลายเป็นอะซิติล โค เอ อันเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์ แต่ในสภาวะที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงเกินไป ทำให้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตนั้นมีจำนวนน้อยเกินไป ทำให้มีเซลล์ที่สามารถเซลล์เพื่อสร้างไขมันได้น้อย

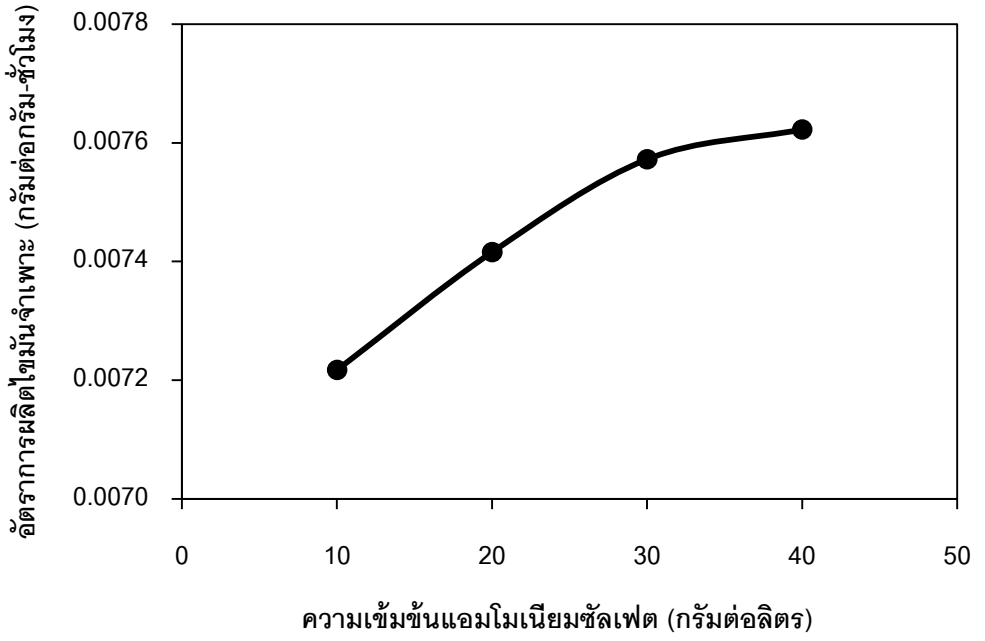
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันจากการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* โดยการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.12 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆ (ก) 10 กรัมต่อลิตร (ข) 20 กรัมต่อลิตร (ค) 30 กรัมต่อลิตร (ง) 40 กรัมต่อลิตร



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.13 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R.graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตในแหล่งอาหารเท่ากับ 10-40 กรัมต่อลิตร (ก) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ข) อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ

ตารางที่ 4.11 ผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยแปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต

ตัวแปร	**ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)**			
	10	20	30	40
ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร)	9.256	9.452	10.040	12.910
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	100.267	98.663	99.732	100.802
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	97.326	95.721	96.791	97.860
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	15.990	16.470	18.440	21.940
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมน้ำตาล)	10.127	9.935	10.373	13.192
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมเซลล์แห้ง)	57.886	57.389	59.328	61.040
อัตราการผลิตไขมัน (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.082	0.079	0.084	0.108
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.075	0.076	0.077	0.078
อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.007	0.007	0.007	0.008

4.6 ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการผลิตไขมัน

ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นฟอสฟอรัสในแหล่งอาหารต่อการผลิตไขมันของการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* โดยใช้น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยทำการแปรผันความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 10 - 40 กรัมต่อลิตร เป็นไปดังรูปที่ 4.14 และตารางที่ 4.12-4.13

ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.14 (ก) จะมีปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 13.510 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 64.395 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีค่าสูงเมื่อเทียบกับการใช้ความเข้มข้นค่าอื่นๆ และให้น้ำหนักเซลล์สูงสุดถึง 20.980 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองของการใช้ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 20 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.14 (ข) ได้น้ำหนักเซลล์และปริมาณไขมันสูงสุดคือ 20.500 และ 11.280 กรัมต่อลิตร

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 30 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.14 (ค) จะได้น้ำหนักเซลล์สูงสุดและปริมาณไขมันสูงสุดที่ได้ มีค่าสูงกว่าเล็กน้อย คือ 20.240 และ 10.584 กรัมต่อลิตร

ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* โดยใช้ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.14 (ง) มีปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 10.130 กรัมต่อลิตรซึ่งคิดเป็นร้อยละ 61.465 โดยน้ำหนัก ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมีค่าเท่ากับ 20.740 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าที่ได้จากสภาวะอื่น

สำหรับค่าทางจลน์ศาสตร์ที่คำนวณได้นั้น ดังตารางที่ 4.13 และการเปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตไขมันจำเพาะไว้ในรูปที่ 4.15 แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ใช้มีผลต่อการผลิตไขมันของเชื้อมากกว่าการเจริญเติบโต เนื่องจากค่าอัตราการผลิตไขมันจำเพาะที่ได้มีค่าแตกต่างกัน ส่วนค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน โดยแตกต่างกันเพียงร้อยละ 3-6 ท่านั้น

แหล่งฟอสฟอรัสมี ความสำคัญ ต่อการผลิตไขมันเช่นเดียวกับแหล่งไนโตรเจน จากงานวิจัยของ Wu และคณะ (2010) พบว่า เมื่อฟอสฟอรัสในอาหารหมดไป จะส่งผลให้ปริมาณ AMP ภายในเซลล์ลดต่ำลง เนื่องจากเซลล์จะทำการสลาย AMP เพื่อนำฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในสาร AMP นี้ไปใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อความเข้มข้นของ AMP ลดต่ำลงก็จะส่งผลต่อเอนไซม์ไอโซซิเตรส ดีไฮโดรจีเนสและความเข้มข้นของซิเตรตภายในไมโทคอนเดรียเช่นเดียวกับการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ใน

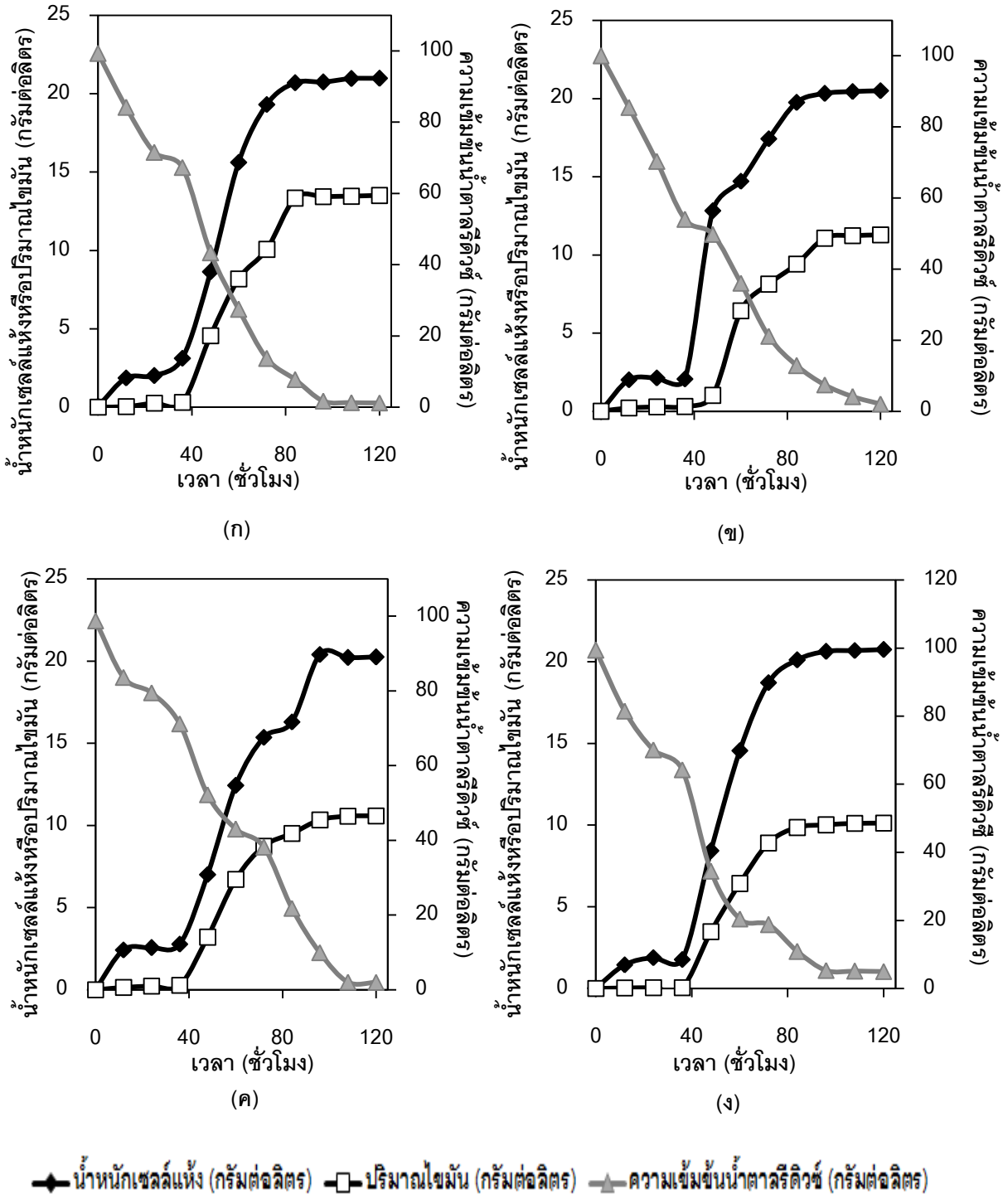
สภาวะขาดแคลนไนโตรเจน การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในความเข้มข้นน้อยที่สุด หรืออัตราส่วนคาร์บอนต่อฟอสฟอรัสสูงที่สุด จะทำให้ยีสต์มีการสะสมไขมันสูงที่สุด นอกจากนี้การจำกัดฟอสฟอรัสในสารอาหารนี้ช่วยส่งเสริมการใช้คาร์บอนหรือน้ำตาลรีดิวซ์ของเซลล์อีกด้วย

สำหรับค่าพารามิเตอร์ต่างๆนั้น แสดงดังตารางที่ 4.12 จากตารางเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตนั้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพของทั้งการสร้างไขมันภายในเซลล์และการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการสร้างไขมัน เนื่องจากมีค่า Yp/s_{max} และค่า Yp/x_{max} ลดลงเมื่อความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างจากค่า Yx/s_{max} ที่มีค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยคือร้อยละ 1.880 - 7.512 จากค่าสูงสุด แสดงว่า ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตนั้นส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ให้เป็นเซลล์

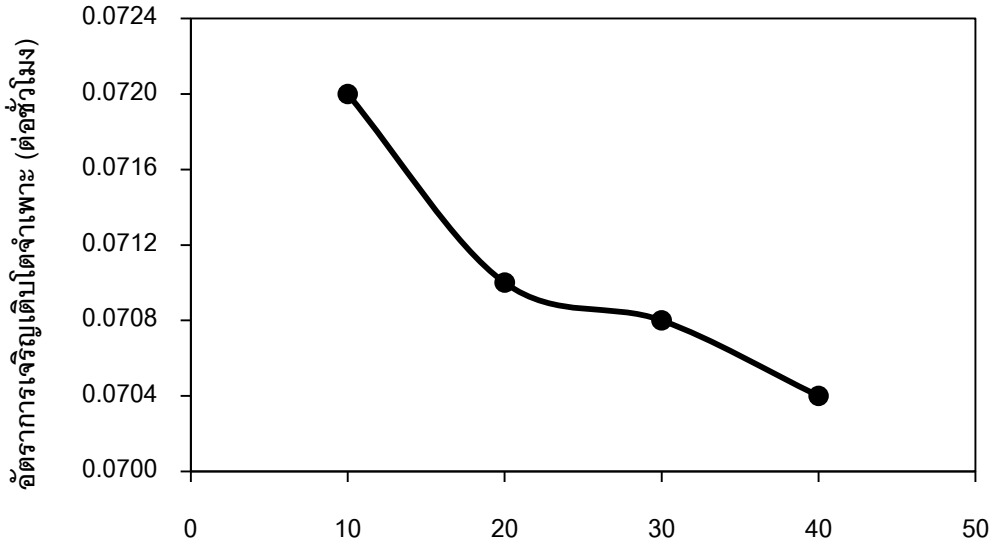
ตารางที่ 4.12 ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร)	Yx/s_{max} **(กรัมต่อกรัม)**	Yp/s_{max} **(กรัมต่อกรัม)**	Yp/x_{max} **(กรัมต่อกรัม)**
10	0.213	0.137	0.644
20	0.209	0.115	0.550
30	0.209	0.109	0.523
40	0.197	0.107	0.488

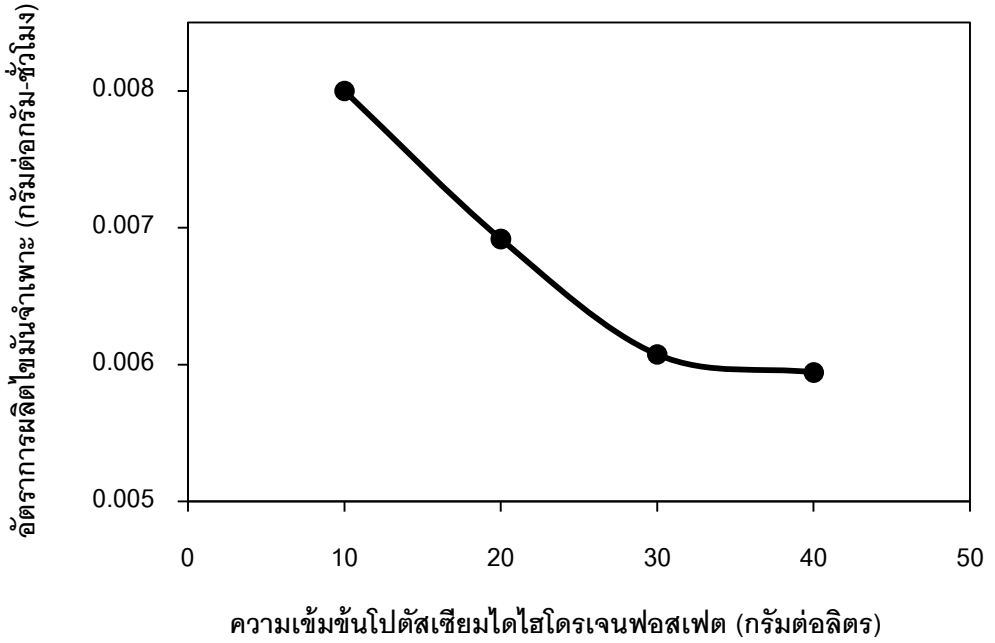
ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันของเชื้อ *R. glutinis* โดยใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนคือ ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.14 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด ดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่างๆ (ก) 10 กรัมต่อลิตร (ข) 20 กรัมต่อลิตร (ค) 30 กรัมต่อลิตร (ง) 40 กรัมต่อลิตร



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.15 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 - 40 กรัมต่อลิตร (ก) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ข) อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ

ตารางที่ 4.13 ผลของความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ตัวแปร	**ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร)**			
	10	20	30	40
ปริมาณไขมัน (กรัม/ลิตร)	13.510	11.280	10.584	10.130
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	100.000	99.400	98.773	99.320
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	98.558	97.920	96.764	94.37
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	20.980	20.500	20.24	20.740
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมัน/กรัมน้ำตาล)	13.708	11.520	10.938	10.734
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมัน/กรัมเซลล์แห้ง)	64.395	55.024	52.292	48.843
อัตราการผลิตไขมัน (กรัม/ลิตร-ชั่วโมง)	0.113	0.094	0.088	0.084
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	0.072	0.071	0.071	0.0704
อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.008	0.007	0.006	0.006

4.7 ผลการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *R.glutinis* ด้วยสภาวะที่ทดลองได้ในถังปฏิกรณ์

การเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์นั้นเป็นการทดลองเพื่อเพิ่มขนาดการผลิตในเบื้องต้นก่อนที่จะมีการนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสามรถควบคุมปัจจัยต่างๆได้ดีกว่า เช่น ค่าความเป็นกรดเบส อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต (สาวิตรี ลิ่มทอง , 2002) ผลการทดลองในระดับขวดเขย่าทั้งหมด ทำให้สามารถปรับสูตรอาหารน้ำเชื่อมสำหรับเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ดังนี้ คือ น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตและโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 40 และ 10 กรัมต่อลิตร ใช้สภาวะที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวนในถังปฏิกรณ์ 180 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.33 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

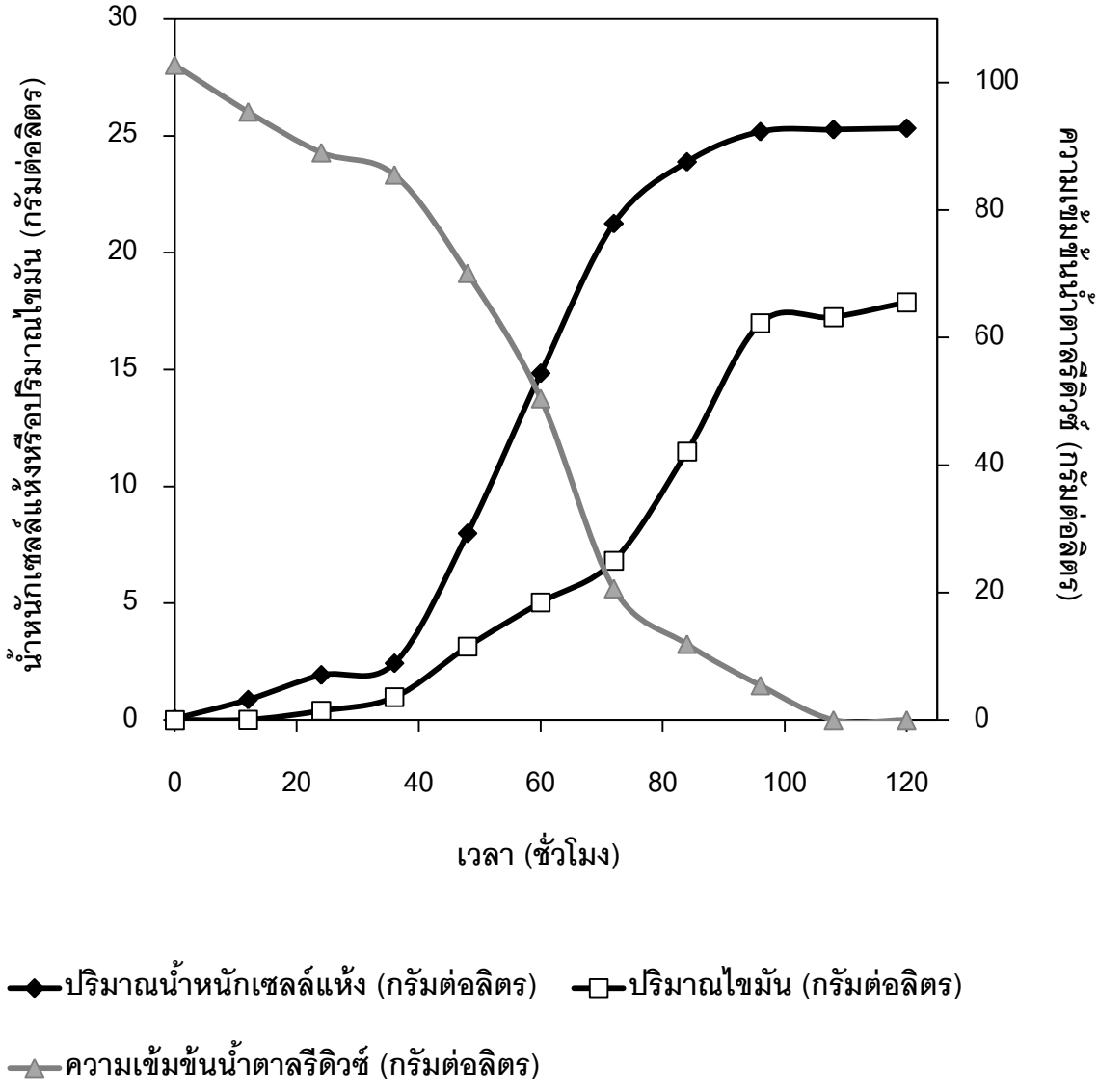
ผลการผลิตไขมันของเชื้อ *R. glutinis* ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตรนั้น แสดงในรูปที่ 4.16-4.17 และตารางที่ 4.14-4.15 จะเห็นได้ว่า การใช้น้ำตาลรีดิวซ์นั้นมีปริมาณการใช้เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36-72 พร้อมกับการเพิ่มขึ้นของเซลล์ ส่วนการผลิตไขมันนั้นเกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 36 น้ำหนักเซลล์สูงสุดและปริมาณไขมันสูงสุด มีค่า 25.330 และ17.872 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการทดลองในระดับขวดเขย่าประมาณร้อยละ 6.162 และ 24.41 ตามลำดับ นอกจากนี้เชื้อยีสต์สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเหลืออยู่ในระบบน้อยกว่าร้อยละ 0.1 ของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น แสดงให้เห็นว่า การเลี้ยงในถังปฏิกรณ์มีส่วนเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารน้ำเชื่อมในการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. glutinis* เพื่อสร้างไขมัน

ตารางที่ 4.14 ค่าพารามิเตอร์จากการผลิตไขมันของ *R. glutinis* เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

การเลี้ยงเชื้อ	Yx/s_{max} **(กรัมต่อกรัม)**	Yp/s_{max} **(กรัมต่อกรัม)**	Yp/x_{max} **(กรัมต่อกรัม)**
ขวดเขย่า 500 มิลลิลิตร	0.213	0.137	0.644
ถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร	0.246	0.174	0.706

เมื่อพิจารณาถึงค่าพารามิเตอรต่างๆที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการเจริญเติบโต , การใช้น้ำตาลและการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นไขมันของเซลล์ดังตารางที่ 4.14 นั้นพบว่าค่าพารามิเตอร์ทุกค่ามีค่าเพิ่มขึ้น โดยค่า Yp/s_{max} มีค่าเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 21.264 จากการทดลองที่ผ่านมา ในขณะที่ค่า Yp/x_{max} และ Yx/s_{max} มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 13.415 และ 8.782

ผลที่ได้ในงานวิจัยนี้สอดกับงานวิจัยของ Jacob (1992) ซึ่งได้รายงานถึงการเพิ่มขึ้นของการผลิตไขมันในเชื้อยีสต์ *R. glutinis* IIP-30 เมื่อใช้อาหารน้ำตาลกลูโคส ในระดับถังปฏิกรณ์ ส่วน Ykema และคณะ (1988) ที่รายงานว่า การเลี้ยงเชื้อ *A. curvatum* ATTCC 20509 ในถังปฏิกรณ์นั้น ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไขมันของเชื้อ ได้ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าถึงร้อยละ 12 เช่นกัน



รูปที่ 4.16 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต10 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

รูปที่ 4.17 การเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร และสภาวะแวดล้อมที่คัดเลือกได้

ตารางที่ 4.15 ผลการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* และค่าจลน์ศาสตร์ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

ตัวแปร	**ค่าที่ได้**
ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร)	17.872
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	102.773
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	102.770
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	25.330
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมน้ำตาล)	17.390
ร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมเซลล์แห้ง)	70.557
อัตราการผลิตไขมัน (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.149
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.046
อัตราการผลิตไขมันจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.013

4.8 องค์ประกอบของไขมันที่ได้

จากผลการทดลองการผลิตไขมันจากยีสต์ เมื่อนำไขมันที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในสภาวะที่ดีที่สุด คือ การเลี้ยงเชื้อ *R.glutinis* ที่น้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร โดยการเลี้ยงเชื้อแบบกะในถังหมักขนาด 3 ลิตร นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี ดังแสดงในตารางที่ 4.16 พบว่า องค์ประกอบของไขมันที่ได้ คือ มีกรดโอเลอิค (C18:1) ร้อยละ 58.210 กรดปาล์มมิติค (C16:0) ร้อยละ 20.090 กรดสเตียริค (C18:0) ร้อยละ 4.820 กรดลิโนเลอิค (C18:2) ร้อยละ 7.280 ซึ่งองค์ประกอบของไขมันที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ratledge และ Tan (1990) ที่กล่าวว่าองค์ประกอบหลักของไขมันที่ได้จากยีสต์ ไขมันสูงจะมีกรดโอเลอิค กรดปาลมิติค กรดสเตียริค และกรดลิโนเลอิค จัดเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว จึงทำให้เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างไขมันที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้ แสดงในรูปที่ 4.18

จากตารางที่ 4.17 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบองค์ประกอบไขมันที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในการทดลองนี้กับไขมันที่ได้จากแหล่งอื่นๆ ซึ่งทำให้พบว่า ไขมันที่ได้นั้นมีองค์ประกอบคล้ายกับไขมันที่ได้จากพืชคือ มีปริมาณกรดโอเลอิคเป็นองค์ประกอบหลักและมีในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ซึ่งแตกต่างจากน้ำมันที่ได้จากสัตว์ทั่วไป ทั้งนี้ ไขมันที่มีกรดโอเลอิคเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงนั้น กำลังเป็นที่ต้องการของตลาด เนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพคือ ช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด ช่วยปรับสภาพการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ดังนั้นหากสามารถพัฒนากระบวนการผลิตไขมันจากยีสต์ต่อไป จนถึงระดับอุตสาหกรรมเพื่อนำไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์มาทดแทนไขมันหรือน้ำมันที่ผลิตได้จากแหล่งอื่นๆ ถือเป็นแนวคิดที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง การผลิตไขมันจากยีสต์นั้นมีความได้เปรียบทางด้านของต้นทุนการผลิตเนื่องจากสามารถใช้สารอาหารอย่างง่าย หรือ ใช้แหล่งคาร์บอนเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอย่างหลากหลายกว่า และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสั้น

ในปัจจุบันเนื่องมาจากปัญหาของการขาดแคลนพลังงาน ทำให้มีการเสาะแสวงหาแหล่งน้ำมันหรือเชื้อเพลิงในรูปแบบอื่นๆ ไขมันที่ได้จากยีสต์นั้นมีองค์ประกอบที่คล้ายน้ำมันพืชกลุ่มของปาลม์ ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล ในงานวิจัยของ Dai และคณะ (2007) ได้รายงาน

ถึงการนำไขมันยีสต์ในการผลิตไบโอดีเซล โดยลักษณะและองค์ประกอบที่ได้นั้นไม่แตกต่างกับใช้น้ำมันจากพืชเป็นสารตั้งต้น

ตารางที่ 4.16 องค์ประกอบของไขมันที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

กรดไขมัน	ร้อยละโดยน้ำหนัก
Myristic acid (C14:0)	1.090
Palmitic acid (C16:0)	20.090
Palmitoleic acid (C16:1)	0.860
Stearic acid (C18:0)	4.820
Oleic acid (C18:1)	58.210
Linoleic acid (C18:2)	7.280
Linolenic acid (C18:3)	1.660
Arachidic acid (C20:0)	0.220
Eicosenoic acid (C20:1)	0.310
Benhenic acid (C22:0)	0.240
Erucic acid (C22:1)	0.460
Lignoceric acid (C24:0)	0.530

*งานวิจัยนี้ได้ทำการวัดค่าคาร์บอนตั้งแต่ C 6-25 และมีกรดไขมันบางตัวที่ไม่ได้นำมาแสดงนั้น เนื่องจากมีปริมาณน้อยมาก

ตารางที่ 4.17 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของไขมันที่ได้จากแหล่งต่างๆ

แหล่งไขมัน	**องค์ประกอบของไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)**											
	Myristic acid (C14:0)	Palmitic acid (C16:0)	Palmitoleic acid (C16:1)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18:3)	Arachidic acid (C20:0)	Eicosenoic acid (C20:1)	Benhenic acid (C22:0)	Erucic acid (C22:1)	Lignoceric acid (C24:0)
น้ำมันจากยีสต์ที่ได้จากการทดลอง	1.1	20.1	0.9	4.8	58.2	7.3	1.7	0.2	0.3	0.2	0.5	0.5
น้ำมันมะกอก	-	16.9	1.8	2.7	61.9	14.8	0.6	0.4	-	-	-	-
น้ำมันโจโจบาร์	-	3.0	1.0	1.0	5.0	5.0	1.0	0.5	65.0	0.5	10.0	5.0
น้ำมันปาล์ม	1.0	48.0	-	4.0	38.0	9.0	-	-	-	-	-	-
น้ำมันมะพร้าว	18.1	8.8	-	2.6	6.2	10	1.6	-	-	-	-	-

(ที่มา Turcotte และ Kosaric, 1989)

รูปที่ 4.18 ไขมันที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต10 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดลองคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไขมันจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้

เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นั้นสามารถเจริญเติบโตและผลิตไขมัน เมื่อใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งคาร์บอนและไม่มีการเติมสารอาหารใดๆได้เป็นอย่างดี แต่ประสิทธิภาพการผลิตไขมันแตกต่างกัน เป็นค่าเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ ในแต่ละสภาวะความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น คือ การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ 50 กรัมต่อลิตรมีค่าต่ำเกินไป ทำให้มีการใช้น้ำตาลหมดก่อนเวลา 120 ชั่วโมง และการใช้น้ำตาลสูงถึง 200 กรัมต่อลิตรมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตจากความเข้มข้นของซับสเตรท รวมทั้งมีน้ำตาลเหลือในระบบค่อนข้างสูง เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตไขมันได้ดีที่สุดคือเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *R.Glutinis* โดยใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งอาหารสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้ คือ

เชื้อ *R.Glutinis* สามารถเจริญเติบโตเพื่อผลิตไขมันได้ในช่วงความเป็นกรดเบสที่กว้าง คือ ช่วงค่าความเป็นเบส 4.0-6.0 เนื่องจากเชื้อมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกันในทุกสภาวะที่ใช้ทดลอง แต่ปริมาณไขมันที่ได้นั้นต่างกัน โดยที่ความเป็นกรดเบส 4.0 มีความเหมาะม ทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไขมันสูงสุด

ส่วนอิทธิผลของอุณหภูมิ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *R.Glutinis* อย่างเห็นได้ชัด เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 35 และ 40 องศาเซลเซียส แต่ประสิทภาพการสร้างไขมันมีค่าลดลง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างไขมันได้สูงสุดคือ 28 องศาเซลเซียส ส่วนการเลี้ยงที่อุรหภูมิต่ำกว่านี้ จะทำให้มีการเจริญเติบโตน้อย

ส่วนอิทธิผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีผลต่อการผันแปรของปริมาณไขมันที่ได้ คือ อัตราส่วนที่ต่ำเกิน จะมีผลให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไขมันน้อยมาก เนื่องจากไนโตรเจนที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตในแหล่งอาหารเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร หรือ ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 : 1 โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณไขมันเท่ากับ 21.940 และ 12.910 กรัมต่อลิตร

การเติมแหล่งฟอสฟอรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น พบว่า ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *R.Glutinis* เนื่องจากเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในทุกสภาวะ จะมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในระบบน้อยกว่าร้อยละ 1 ของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นฟอสฟอรัสในแหล่งอาหารนั้นส่งผลต่อการผลิตไขมัน แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันทุกสภาวะ แต่ปริมาณไขมันที่ได้มีค่าแตกต่างกัน โดยเชื้อ *R.Glutinis* สามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร

สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตไขมันในงานวิจัยนี้ คือ การเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* โดยใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งเป็นแหล่งอาหาร ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตและโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในแหล่งอาหารเท่ากับ 40 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ในระดับถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร พบว่า จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไขมัน โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่สูงขึ้น เนื่องจากสามารถควบคุมค่าความเป็นกรดเบสและอัตราการให้อากาศให้คงที่ รวมทั้งการกวนมีผลทำให้เชื้อมีการสัมผัสอาหารได้ดีขึ้น เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไขมันของเชื้อ *R.Glutinis* เมื่อใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้ง กับสายพันธุ์ยีสต์อื่นที่ใช้วัตถุดิบต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน แสดงในตารางที่ 5.1 พบว่าน้ำเชื่อมเหลือทิ้งมีศักยภาพสำหรับเป็นวัตถุดิบในการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์ไขมันสูง โดยไขมันที่ได้มีคุณภาพดีเหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร หรือนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล เพื่อเป็นพลังงานทดแทนได้ โดยมีปริมาณไขมันค่อนข้างสูง ค่าร้อยละผลได้ไขมันที่ได้จากการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ 3 ลิตร มีค่า 70.6 จัดเป็นค่าที่สูงกว่าค่าที่ได้จากงานวิจัยของ Jacob (1992) ซึ่งได้ค่าร้อยละผลได้ของไขมัน 66 จากการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์ *R. glutinis* IIP-30 จากน้ำตาลกลูโคส ในระดับถังปฏิกรณ์

นอกจากนี้การใช้น้ำเชื่อมเหลือทิ้งในการเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้อย่างดี ดังนั้นกระบวนการเลี้ยงเชื้อยีสต์พื่อผลิตไขมันจากน้ำเชื่อมเหลือทิ้งจึงเป็นกระบวนการที่น่าสนใจในการศึกษาและพัฒนาต่อไป

ตารางที่ 5.1 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไขมัน ของเชื้อ *R.Glutinis* เมื่อใช้วัตถุดิบต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

สภาวะในการหมัก				ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)	ชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	เอกสารอ้างอิง
วัตถุดิบ	ความเข้มข้นวัตถุดิบ (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดด่าง			
กลูโคส	30	30	4	66	22.3	Johnson และคณะ, 1992
กากน้ำตาล	20-40	32	5.5	39	15.0	Alvarez และคณะ, 1992
กลูโคส	30	30	4	66	22.3	Jacob, 1992
กากน้ำตาล+ กลูโคส+ซูโครส	30	30	4	39.00	17.20	Johnson และคณะ, 1995
ไซโลส	30	28	5.8	12.00	6.9	Li และคณะ 2005
กลูโคส	100	28	5.0	49.25	29.77	Dai และคณะ, 2007
กลูโคส	40	30	6.0	23.80	10.21	VijayaKumar และคณะ, 2010
ซูโครส	40	30	4	14.85	6.20	
ฟรุกโตส	40	30	4	20.61	7.64	
น้ำเชื่อมเหลือทิ้ง	100	28	4	64.395	20.980	งานวิจัยนี้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการเลี้ยงเชื้อโดยการวัตถุดิบที่เหลือใช้อื่นๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งฟอสฟอรัส เช่น ยีสต์สกัดที่ได้จากโรงงานผลิตเบียร์ หางนม หรือกากถั่วเหลือง เป็นต้น เนื่องจากเป้นแลห่งอาหารเชิงซ้อนที่มีแร่ธาตุหรือสารอาหารอื่นอีกมาก จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริยเติบโตเพื่อสร้างไขมันของยีสต์ไขมันสูงขั้น และเป็นการลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลงยิ่งขึ้น ส่งผลให้มีความคุ้มค่าทางการลงทุนมากยิ่งขึ้น

2.ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไขมันจากยีสต์โดยใช้น้ำเชื่อเหลือทิ้งคือ 100 กรัมต่อลิตรอาจเป็นไปได้ว่าหากมีระยะเวลาการหมักที่นานขึ้นเชื้อยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเลี้ยงโดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงรูปแบบการเลี้ยงเชื้อที่สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น เช่น วิธีการหมักแบบกึ่งกะ หรือต่อเนื่อง เป็นต้น

3. ควรมีการนำไปศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมในการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ โดยอาจเลือกเอาองค์ประกอบที่มีราคาสูงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และอาจมีการนำความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการตัดต่อพันธุกรรมของเชื้อเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมากขึ้น

4. ควรมีการเปลี่ยนกระบวนการในการสกัดไขมันโดนอาจจะทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการที่แตกต่างกันที่ใช้ในการสกัดไขมันหรืออาจจะศึกษาถึงตัวทำละลายชนิดอื่นๆที่จะนำมาใช้

5. อาจมีการนำไขมันที่ผลิตได้ ไปทดลองใช้ประโยชน์ในด้านโภชนาการหรือในด้านการทำเครื่องสำอางค์เพื่อดูประสิทธิภาพของไขมันที่ได้

รายการอ้างอิง

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม สถิติข้อมูลโรงงานอุตสาหกรรมประเภท ก ประจำปี 2540 : มปท., กรุงเทพมหานคร. 2540

บำเพ็ญ นิ่มเขียน.2545. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ไขมันสูงที่ย่อยแป้งได้เพื่อผลิตไขมันเซลล์เดี่ยวจากแป้งมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

มนูเทพ กนกศิลป์. 2533. ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตไขมันของยีสต์ *Rhotorula Gracilis*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต , สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

Akindumila,F. and Glatz B,A. 1998. Growth and oil production of *Apiotrichum curvatum* in tornado juice. J. Food Protection. 61,11 : 1,515-1,517.

Allen et al. 1964, “Factors Affection the Growth and Fat Forming of *Rhodotorula gracilis*.” J. Appied Bacteriology, Vol. 27, pp. 27 – 33.

Angerbauer et al. 2008. Conversion of sewage sludge into lipid by Lipomyces starkeyi for biodiesel production. Bioresour. Technol. 99, 3051-3056.

Bati et al. 1984. Biomodification of fats and oils trials with *Candida lipolytica*. JAOCS. 6 ,11 : 1,743-1,748.

Boulton , A.C. and Ratledge , C. 1981. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP : citrate lyase. J. Gen. Microbiol. 127 : 16-176.

Chanda and Chakrabatri. 1996. Plant origin waste : a source for single cell protein production by yeast. Bioresource Technology. 57 : 51-54

Danie., H.-J., Oho,R.T., Reuss,M., Syladtte,C. and Binder,M. 1999. Production of sophorolipids from whey: development of a two—stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51 : 40 – 45

Daum,G., Lees ,N.D., Bard, M., and Dickson, R. 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipid of Saccharomyces cerevisiae. Yeast ,14 : 1471-1510

Davies et al. 1990. The effect of low oxygen up take rate on the fatty acid profile of the

oleaginous yeast Apiotrichum curvatum. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33 : 569-573.

Dostalek and Milan.1986. Production of lipid from starch by a nitrogen controlled mixed culture of *Saccharomycopsis fibuliger* and *Rhodosporidium toruloides*. Appl. Microbiol Biotechnol. 24 : 19-23.

Dyatlovitskaya, Z.U., Greshnykn, K.P., Zhadannikova, E.N. and Kozlova. 1969 . Effect of pH on the lipid composition of Candida yeast grown on n-alkanes. Prikl. Biokim. Microbial. 5, 511-514

Enebo, L., Anderson, L.G., and Lundin, H., 1946, "Microbiological Fat Synthesis by means of Rhodotorula Yeast." Archs. Biochem. Biophys., Vol. 11, pp. 383 – 389

Evans, C.T. and Ratledge,C. 1983. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. J. of General microbiology. 130 : 1,963-1,704.

Fall, R., Phelps, P. and Spindler,D. 1984. Bioconversion of xylan to triglycerides by oil-rich yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 47, 5 : 1,130-1,134.

Gierhart , D.L., 1984. Preparation of fats and oils. U.S. patent no. 4,485,173. Nov.

Gill, C.O., Hall, M.J., Ratledge , C., 1977. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (Candida 107) growing on glucose in single-stage continuous culture . Appl. Environ. Microbiol. 33, 784-789

Glatz , B.A. and Hammond, E.G. 1985 . Fermentation other food wastes to produce microbial lipid. J. of Food Protection. 48 ,7 : 574-577.

Goulet, J. (1975) Production of Lipids by Rhodotorula glutinis, Ph.D. thesis, McGill University in Montreal, Canada.

Granger , L.M., Perlot, P., Goma,G. and Pareilleux, A. 1992. Kinetic of growth and fatty acid production of *Rhodotorulla glutinis*. Appl. Microbiol, Biotechnol. 37 : 13-17.

Hall, M.J. and Ratledge, C. 1977 Lipid accumulation in an oleaginous yeast (Candida 107) growing on glucose under various condition in a one and two-stage continuous culture. Applied and Environmental Microbiology 33, 577-584

Hammond, E.G. and Glatz, B.A., Choi, Y. and Teasdele, M.T. 1981. New source of

fat and oil : oil production by *Candida curvata* and extraction composition and properties of the oil. In eds Prydeg ,E. H.,Pricen, L.H. and Mukherjee, K.D. American Oil Chemists Society Champaign , IL. : 171-185.

Hammond, E.G. and Glatz, B.A. 1988. Food biotechnology-2 : biotechnology applied to fat and oils. In eds, King ,R.D. and Cheetham ,P.S.J., Elsevier Applied Science , : 173-203.

Hansson, L. and Dostalek, M. 1986. Influence of cultivation condition on lipid production by *Cryptococcus albidus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 : 12-18

Hassan, M., Blanc, P.J., Granger, L.M. (1993) Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown in a single stage continuous culture. Appl Microbiol Biotechnol 40:483-488

Hauer, R. and Hofer, M. 1978, "Evidence for Interactions between the Energy-Dependent Transport of Sugars and the Membrane Potential in the Yeast *Rhodotorula gracilis* (*Rhodosporiodiur toruloides*). J.Membrane Biology, Vol. 43, pp. 333 -345

He, H.P., Cat ,Y., Sun, M. and Corke,H. 2002. Extraction and purification of squalene from Amanthus grain., J. Agric. Food Chem. 50 : 368-372

Hu ,C.M., Zhao, X., Zhao, J., Wu, S.G. and Zhao, Z.B.2009. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides*. Bioresour Technol 100:4843–4847

Huang, W.K. (2000) Food test and analysis. In: Xiong HS (ed) The general ingredients test in food. China Light Industry Press, Beijing, pp 53-54

Jacob, Z. and M.N. Krishnamurthy. 1990. Studies on physicochemical characteristics and fatty acid composition of lipid produced by a strain of Rhodotorula gracilis CFR-1. J. Am. Oil Chem. Soc. 67 : 642-645

Jacob, Z. 1993. Yeast lipid biotechnology: A review. Adv. Appl. Microbiol. 39 : 185 – 212.

Johnson, V., Singh,M.,Saini, V.S., D.K., ADhikari, V.R. Sista and Yadav,N.K. 1992. Bioemulsufier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP. 30. Biotech. Lett. 14:487-490.

Johnson,W., et al.,1995.Utilization of molasses for the production of fat by an

oleaginous yeast,*Rhodotorula glutinis* IIP-30, J. Ind. Microbiol. 14:1-4.

Kates, M., and Baxter, R.M.1962. Lipids composition of mesophilic and phychrophilic yeasts (Candida species) as influenced by environmental temperature. Canadian J. of Biochemistry and Physiology. 40 : 1,213-1,227.

Kessell, R.H.1968. "Fatty Acids of Rhodotorula gracilis : Fat Production in Submerged Culture and the Particular Effect of pH Value." J. Appied Bacteriology, Vol. 31, pp. 220 – 231

Laning, S.J. 1991. Biotechnology and Food ingradients : Fats , Oils , Fatty Acids. And Oilseed Crops. In eds. Goldberg I. and Williams R. Van Nostrand Reinhold. New York.: 265-285.

Li,Y.H., Zhao, Z.B., Bai ,F.W.,2006. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. Chin. J Biotechnol 22(4) : 650 -656

Li,Y.H., Zhao, Z.B., Bai, F.W.,2007a. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. Enzyme Microb. Technol. 41 : 312 – 317

Li ,Z.F., Zhang, L., Shen, X.J., Lai, B.S. and Sun, S.Q.,2001. A comparative study on four methods of fungi lipid extraction. Microbiol 28:72-75

Liu, B., Zhao, Z.K., 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. J. Chem. Technol. Biotechnol. 82, 775-780

Meng, X., Yang, J.M., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q.J., Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renew Energy. 34:1–5

Moon, N.J., Hammond, E.G. and Glatz, B.A.,1978. Convertion of cheese whey and whey permeate to oil and single cell protein. J. Dairy Sci. 61 : 1,537-1,547.

Naganuma , T., Uzaka, Y. and Tanaka, K., 1985. Physiological factors affecting total cell number and lipid content of the yeast, *Lipomyces starkeyi*. J. Gen. App. Micribiol. 31 : 29-37.

Naganuma, T., Uzuka, Y., and Tanaka, K., 1986, Using Inorganic Elements to Control Cell Growth and Lipid Accumulation in Lipomyces starkeyi. J.General Appied Microbiology, Vol. 32, pp. 417 – 424.

Nigam, J.N.,1999. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cell. Journal of Biotechnology. 80 , 2 : 189-193

Pan, J.G. and Rhee, J.S. ,1985. Biomass yield and energetic yields of oleaginous yeasts in batch culture. Biotechnol. Bioeng. 28 : 112-114.

Pan, J.G., Rhee, J.S., 1986. Kinetic and energetic analysis of lipid-accumulation in batch culture of *Rhodotorula glutinis*. J. Ferment. Technol. 64, 557-560.

Papanikolaou, S., chevalot, I., Komaits, M., Marc,I. and Aggelis,G., 2002a. Single cell oil (SCO) production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of amimal fat in batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58 : 308 – 312.

Papanikolaou, S., chevalot, I., Komaits, M., Marc,I. and Aggelis,G., 2002b. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid form raw glycerol. J. Appl. Microbiol. 82 : 737-744.

Prapulla, S.G., Jacob, Z., Chand, N. and Rajalakshi, D. 1992. Maximization of lipids production by *Rhodotorula gracilis* CFR-1 using response sueface methodology. Biotechnology and Bioengineering. 40 : 965-970.

Ratledge, C., 1976, "Grow Fat from Waste," Chemical Society Resources, Vol. 8, pp. 283 – 296

Ratledge, C., 1979, "Resources Conservation by Novel Biological Process," Chemical Society Resources, Vol. 7 – 8, pp. 879 – 918

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 Champainge, IL. : 159-169.

Ratledge, C., 1982, Microbial oil and fats: an assessment of their commercial potential, Prog. Ind. Microbial.16 : 119-206

Ratledge, C. and Evans. C.T., 1989. Metabolism and Physiology of Yeasts : Lipid and Their Metabolism. In eds. Rose A.H. and Harrison J.S. Academic Press Limited. New York. The Yeast. 3 : 367-445.

Ratledge, C. and Tan, K.H. 1990. Oils and fats : Production , Degradation and Utilization by Yeasts. In eds. Verachtert, H. and Rene,D.E. Mot. Marcel Dekker Inc:223-251.

Ratledge, C.,1993. Single cell oils - have they a biotechnological future?,Trend Biotechnology .1: 278-284

Ratledge, C., Wynn, J.P.,2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, Adv. Appl. Microbiol. 51:1–51

Ratledge, C., 2001. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Biochem. Soc. Trans. 30 : 1047 – 1050

Ratledge, C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochimie 86 : 807 – 815.

Rattray, J.B.M., Schibeci, A., and Kidby, D.K., 1975, "Lipids of Yeasts," Bacteriological Review, Vol. 39, pp. 120 – 206

Rattray, J.B.M. 1984. Biotechnology and the fats and oils industry-an overview. JAOCS. 61,11 : 1,985-1,997.

Smit, H., et al., 1992. *In* "Industrial Applications of Single Cell Oils" (D.J.Kyle and Ratledge, eds.), pp. 185 – 195. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.

Smith, S., Witkowski, A. and Joshi, A.K.,2003. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. Prog. Lipid Res., 42, 289-317

Smith, T.J. 2000. Squalene : potential chemopreventive agent., Expert. Opin. Investig. Drugs. 9, 8 :1841-1848

Suutari, M., Priha,P. and Laakso, S., 1993. Temperature shifts in regulation of lipids accumulated by Lipomyces starkeyi. JAOCS. 70,9 : 891-894.

Turcotte, T., Kosaric ,N., 1989 Lipid biosynthesis of Oleaginous yeast. Fiechter, A., Ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, In Advances in Biochemica lEngineering/ Biotechnology. 40 ; 73-92.

Vicente, et al., 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. J. Biochem. Eng. 48, 22-27

Vega, E.Z., Hammond, E.G. and Glatz, B.A. 1988 .Optimization of banana juice fermentation for the production of microbial oil. Appl. and Environment. Microbiology. 54 : 748-752.

Woodbine, M., Microbial fat: microorganisms as potential fat producer, Prog. Ind. Microbial. 1: 181-245.

Xue, F.Y., Zhang, X., Luo, H., Tan, T.W., 2006. A new method for preparing raw material for biodiesel production. Process Biochem. 40,2483-2488

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

Yano , Nagayama A., Saito , H. and Ishihara, K.,1994. Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. Lipids. 29,7 : 527-528.

Yazawa, K., et al., 1988. Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. J.Biochem. 103 : 5-7.

Ykema , A., Bakels , I., Verwort, G.H. and Smit, H., 1989 (a). Growth yield, maintenance requirement, and lipid formation in the oleaginous yeast Apiotrichum curvatum. Biotechnology and Bioengineering. 34 : 1,268-1,276.

Ykema, A., Verbee, E.C., Nijkamp, H.J.J. and Smit, H. 1989 (b). Isolation and characterization of fatty acid auxotroph from the oleaginous *yeast Apiotrichum curvatum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32 : 76-84

Yoon, S.H., and Rhee, J.A., 1983, "Quantitative Physiology of Rhodotorula glutinis for Microbial Lipid Production," Process Biochemistry, pp. 1 – 5.

Zhu, M., Zhou, P.P., Yu, L.J., 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpine* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. Bioresour. Technol. 84, 93-95

Zhao, X., Wu, S.G., Hu, C.M., Wang, Q., Hua, Y.Y., Zhao, Z.B.2010. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodosporidium toruloides* Y4, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37:581–585

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อนั้นใช้อาหารสูตร YPDa ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

(เปอร์เซ็นต์ในหน่วยกรัมต่อลิตร)

Yeast Extract Powder	1%
Peptone	2%
Dextose	2%
Agar	4%

ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองใช้สูตรอาหาร YPD

(เปอร์เซ็นต์ในหน่วยกรัมต่อลิตร)

Yeast Extract Powder	1%
Peptone	2%
Dextose	2%

ก.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาสภาวะการผลิตไขมัน

(เปอร์เซ็นต์ในหน่วยกรัมต่อลิตร)

Yeast Extract Powder	0.1%
KH_2PO_4 **	0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%
$Na_2HPO_4.12H_2O$	0.1%
$MgSO_4.7H_2O$	0.04%
$(NH_4)_2SO_4$ **	0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%
Waste syrup **	5%, 10%, 20%

** ตัวแปรที่ศึกษา

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทุกครั้งต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอบความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีและปรับพีเอช ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 1 หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 เช่นกัน

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

ข.1 วิธีการวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง

นำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิกรัม เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนเซลล์ ทำการล้างตะกอนเซลล์โดยการเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิกรัม แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) จนตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอดนั้นผสมกับน้ำกลั่นจนกลายเป็นสารแขวนลอยอีกครั้ง นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อีกครั้งเติมน้ำกลั่นและทำขั้นตอนเดิมซ้ำอีกครั้ง เมื่อล้างน้ำกลั่นครบสองรอบแล้วทำการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันจนกลายเป็นสารแขวนลอยแล้วนำไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์โดยการชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด คำนวณความเข้มข้นของมวลชีวภาพแห้งในหน่วย กรัมต่อลิตร จากผลต่างและปริมาตรตัวอย่างเริ่มต้น

ข.2 การสกัดไขมัน

นำตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิกรัม มาปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิกรัม จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปสกัดสารประกอบไขมันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการเติมสารละลายคลอโรฟอร์มผสมเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 3.75 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากันนาน 1 นาที ด้วยเครื่องผสมสารละลายแล้วเติมคลอโรฟอร์ม 1.25 มิลลิกรัมลงไปเขย่าต่อ 1 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิกรัม เขย่าประมาณ 15 วินาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์และการแยกชั้นของสารละลาย เก็บชั้นของคลอโรฟอร์มใส่หลอดทดลองที่ทำการอบและชั่งน้ำหนักไว้แล้วจากนั้นก็นำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยการชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียด

ข.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำเชื่อมผลไม้ วิเคราะห์โดยใช้วิธี DNS analysis โดยเริ่มจากย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลคู่ทั้งหมดในตัวอย่าง ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ด้วยสารละลายกรด ที่อุณหภูมิสูง และทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายเบส จากนั้นทำการตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง และนำส่วนใส (supernatant) มาทำปฏิกิริยากับสารละลายไดโนโตร

ซาลิกไซลิก (DNS) ที่อุณหภูมิสูง เกิดสารละลายสีน้ำตาล ซึ่งต้องมีการทำให้เจือจางอย่างเหมาะสม นำไปวิเคราะห์ด้วยเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานซูโครส

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริค

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 20 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ในภาชนะแก้วที่แช่ในอ่างน้ำ เพื่อลดความร้อนที่เกิดขึ้น

เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 37 เปอร์เซ็นต์ โดยการเจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่น ในตู้ระบายอากาศ

2. การเตรียมสารละลายไดโนโตรซาลิกไซลิก (DNS)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.633 กรัม (98 เปอร์เซ็นต์โดยมวล) ในน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) อย่างช้าๆ เติมสาร 3-5-dinitrosaliccylic acid 1 กรัม ในสารละลาย ให้มีการละลายเป็นเนื้อเดียว แล้วทำการเจือจางโดยเติมน้ำ 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสาร Na-K tartrate 30 กรัม ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และเก็บสารละลายในขวดสีชาเป็นเวลา 3 วันก่อนนำมาใช้ และไม่ควรใช้สารละลายที่เก็บไว้นานเกิน 1 เดือน

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานซูโครส

สารละลายซูโครสมาตรฐาน เตรียมโดยการอบซูโครส 3 กรัม ที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และทำการละลายซูโครส 2.5 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร และนำมาเจือจางตามวิธีในตารางที่ ข.1

ตารางที่ ข1.1 การเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0-250 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส (เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร)	สารละลายซูโครส (มิลลิลิตร)	น้ำ (มิลลิลิตร)
0	0	2.0
6.25	0.5	1.5
12.50	1.0	1.0
18.75	1.5	0.5
25.00	2.0	0

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.8 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริค 37 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น หลังจากนั้น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใส 0.2 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นจัด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

การคำนวณ

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ค่าร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมน้ำตาล)

$$Y_{P/S} = \frac{g/L\ Total\ \text{Pr}oducts}{g/L\ Sugar\ utilized} \times 100$$

2. ค่าร้อยละการผลิตไขมัน (กรัมไขมันต่อกรัมเซลล์แห้ง)

$$Y_{P/X} = \frac{g/L\ Total\ \text{Pr}oducts}{g/L\ Dry\ weight} \times 100$$

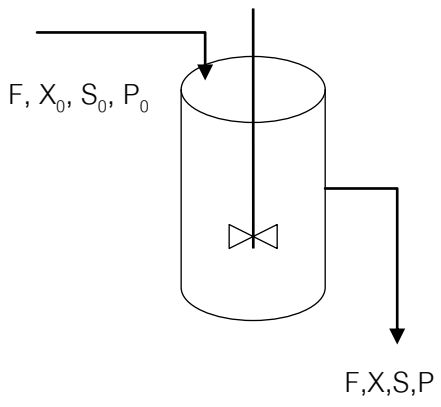
3. ค่าร้อยละการสร้างผลิตภัณฑ์จากเซลล์

$$Y_{X/S} = \frac{g/L\ Dry\ weight}{g/L\ Sugar\ utilized} \times 100$$

4. อัตราการผลิตไขมัน (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง) (productivity)

$$\text{Pr}oductivity = \frac{g/L\ \text{Pr}oducts}{(h)Period\ of\ \ fermentation}$$

5.ค่าจลน์ศาสตร์ของการหมัก



เมื่อ F: เป็นอัตราการไหลเข้า-ออก ของสารละลายอาหาร (กรัมต่อลิตร)

X_0, X : เป็นค่าความเข้มข้นของชีวมวลในสารละลายอาหารที่เข้าออกถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

S_0, S : เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลายอาหารที่เข้าออกถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

P_0, P : เป็นค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ในสารละลายอาหารที่เข้า-ออกถังหมัก (กรัมมต่อลิตร)

V : เป็นปริมาณของสารละลายในถังหมัก (ลิตร)

สมการสมดุลย์เชิงชีวมวล

$$\frac{dX}{dt} = \mu X + \frac{FS_0}{V} - \frac{FX}{V} - \alpha X$$

อัตราการสะสมชีวมวล = อัตราการเกิดชีวมวล+ อัตราการไหลของชีวมวลเข้าสู่ถังหมัก - อัตราการไหลของชีวมวลที่ออกจากถังหมัก - อัตราการตายของชีวมวล

เมื่อ μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) ชั่วโมง$^{-1}$

α = อัตราการตายจำเพาะ (specific death rate) ชั่วโมง$^{-1}$

การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง F=0 เนื่องจาก X_0=P_0=0 ในสภาวะที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว $\mu >> \alpha$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) = $\frac{1}{X}\frac{dX}{dt}$

หมายถึง ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียที่ถูกสร้างขึ้นต่อ หน่วยของจุลินทรีย์ ใน1 หน่วยเวลา (ชั่วโมง)

สมการสมดุลย์เชิงผลิตภัณฑ์

$$\frac{dP}{dt} = \nu X + \frac{FP_0}{V} - \frac{FP}{V} - \kappa P$$

อัตราการสะสมผลิตภัณฑ์ = อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ + อัตราการไหลของผลิตภัณฑ์ที่เข้าสู่ถังหมัก – อัตราการไหลของน้ำหมัก – อัตราการสลายตัวของผลิตภัณฑ์

เมื่อ ν = อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific rate of product formation) กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมชีวมวล-ชั่วโมง

κ = อัตราการสลายตัวของผลิตภัณฑ์ (rate of product destruction) ลิตรต่อชั่วโมง

การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง F=0 เนื่องจาก X_0=P_0=0 ในสภาวะการสร้างผลิตภัณฑ์ $\nu >> \kappa$

อัตราการการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ν) = $\frac{1}{X}\frac{dP}{dt}$

หมายถึง ปริมาณกรดหรือตัวทำละลายที่ถูกสร้างขึ้นต่อ กรัมของจุลินทรีย์ใน1 หน่วยเวลา (ชั่วโมง)

ภาคผนวก ง

ข้อมูลทางการทดลองและกราฟมาตรฐาน

ง.1 ข้อมูลทางการทดลอง

ตารางที่ ง1.1 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis, Rs. toruloides* และ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร

เวลา	*Rosdotorula Glutinis*			*Rhodosporidium toruloides*			*Rhodotorula graminis*		
(ชม.)	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ปริมาณน้ำตาล	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ปริมาณน้ำตาล	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ปริมาณน้ำตาล
0	0.038	0.004	50.238	0.038	0.004	50.879	0.042	0.003	51.603
12	0.160	0.018	45.571	0.060	0.007	47.340	0.044	0.004	48.122
24	0.650	0.084	36.757	0.080	0.016	40.150	0.086	0.007	45.743
36	1.140	0.190	28.980	0.280	0.044	32.472	0.230	0.021	39.880
48	2.910	0.329	20.166	1.270	0.234	23.360	0.450	0.042	30.153
60	4.770	0.754	13.426	2.640	0.857	19.825	1.330	0.136	24.224
72	6.410	1.632	6.686	4.230	1.123	16.449	2.810	0.192	20.120
84	9.210	2.560	4.094	6.690	1.472	12.912	4.640	0.300	17.230
96	12.280	2.834	4.094	8.250	1.960	10.071	5.810	0.324	12.460
108	13.720	2.897	4.094	9.040	2.021	7.490	5.870	0.339	10.780
120	13.880	2.899	4.094	9.060	2.083	4.130	5.920	0.345	6.570

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.2 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis, Rs. toruloides* และ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชม.)	*Rosdotorula Glutinis*			*Rhodosporidium toruloides*			*Rhodotorula graminis*		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ปริมาณน้ำตาล	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ปริมาณน้ำตาล	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ปริมาณน้ำตาล
0	0.040	0.003	98.974	0.037	0.004	103.587	0.041	0.003	102.043
12	0.160	0.016	94.826	0.048	0.009	99.802	0.082	0.006	96.311
24	0.610	0.069	85.494	0.060	0.019	92.121	0.210	0.018	87.522
36	1.540	0.198	74.087	0.600	0.076	76.911	0.380	0.033	81.421
48	3.670	0.860	63.718	1.230	1.089	70.920	1.690	0.144	74.993
60	6.910	2.310	51.275	3.890	2.089	62.685	2.640	0.295	67.240
72	9.540	4.330	39.350	4.680	3.140	51.300	4.320	0.385	61.337
84	12.180	5.800	23.277	8.010	4.541	36.550	6.630	0.443	57.158
96	16.560	7.920	11.352	9.130	6.140	22.450	6.810	0.513	54.103
108	16.890	8.010	6.686	14.260	6.541	16.020	6.980	0.565	52.436
120	0.040	0.003	5.131	14.940	6.583	7.540	6.950	0.579	51.021

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.3 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis, Rs. toruloides* และ *R. graminis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 200 กรัมต่อลิตร

	Rosdotorula Glutinis			*Rhodosporidium toruloides*			*Rhodotorula graminis*		
เวลา(ชม.)	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ปริมาณน้ำตาล	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ปริมาณน้ำตาล	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ปริมาณน้ำตาล
0	0.039	0.005	199.557	0.040	0.004	198.012	0.040	0.003	201.121
12	0.110	0.013	186.077	0.045	0.005	196.231	0.060	0.004	198.784
24	0.270	0.046	171.560	0.096	0.011	191.498	0.090	0.007	195.980
36	0.380	0.070	160.672	0.190	0.023	183.680	0.180	0.017	186.370
48	0.910	0.134	154.450	0.620	0.074	176.521	0.380	0.032	177.112
60	1.190	0.182	142.525	1.230	0.151	172.114	2.140	0.156	168.031
72	1.540	0.240	126.453	2.680	0.212	168.867	3.700	0.406	163.129
84	2.120	0.367	117.639	3.040	0.365	160.015	4.140	0.430	154.630
96	2.580	0.481	109.343	4.450	0.401	156.430	5.200	0.545	150.744
108	2.810	0.501	107.788	5.970	0.424	150.780	5.280	0.553	148.340
120	2.820	0.492	104.677	6.010	0.580	149.010	5.360	0.565	147.540

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.4 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและที่ค่าความเป็นกรดเบส 8.0

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.040	0.003	98.677
12	0.200	0.041	83.862
24	0.410	0.076	78.571
36	1.650	0.311	63.757
48	3.600	0.980	58.466
60	7.410	3.140	41.534
72	10.130	4.880	33.069
84	14.660	7.150	26.190
96	17.140	8.002	25.661
108	17.260	8.076	24.603
120	17.560	8.181	14.074

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.5 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.039	0.004	100.265
12	0.230	0.034	83.333
24	0.620	0.081	74.339
36	1.830	0.345	65.344
48	3.940	1.090	55.820
60	7.560	3.510	44.180
72	11.640	5.670	30.423
84	13.460	8.350	19.841
96	16.890	9.035	10.847
108	18.940	9.104	2.910
120	18.120	9.237	2.910

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.6 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและที่ค่าความเป็นกรดเบส 6.0

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.038	0.003	98.677
12	0.180	0.019	87.037
24	0.570	0.073	65.344
36	1.610	0.204	54.233
48	3.810	0.890	41.534
60	7.430	2.820	35.185
72	9.580	4.500	24.603
84	12.340	5.230	18.254
96	18.130	8.950	14.021
108	18.850	9.006	5.026
120	18.960	9.070	2.910

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.7 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้องและที่ค่าความเป็นกรดเบส 6.0

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.004	0.003	99.735
12	0.160	0.015	88.624
24	0.550	0.070	78.042
36	1.630	0.198	66.931
48	3.900	0.920	58.995
60	5.890	2.550	43.122
72	9.010	3.980	38.889
84	13.680	5.780	27.249
96	16.660	7.880	18.254
108	17.340	8.140	9.788
120	17.990	8.220	2.910

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.8 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.036	0.004	99.670
12	1.020	0.013	95.960
24	1.680	0.067	80.120
36	1.980	0.143	73.430
48	6.030	3.010	57.010
60	7.440	3.450	42.720
72	10.180	4.450	31.120
84	18.780	6.120	10.210
96	18.460	9.030	8.560
108	18.540	9.290	4.080
120	18.890	9.450	3.210

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.9 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.034	0.004	99.820
12	1.120	0.120	96.740
24	1.890	0.230	90.030
36	5.630	1.430	70.810
48	10.890	3.540	60.050
60	16.160	6.890	33.420
72	17.140	9.590	10.850
84	19.430	10.630	10.340
96	19.620	10.720	5.160
108	19.660	10.840	1.280
120	19.690	10.970	0.970

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.10 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.040	0.004	101.720
12	0.060	0.004	90.500
24	0.069	0.004	87.430
36	2.430	1.020	65.010
48	8.740	4.120	41.270
60	9.120	6.230	34.520
72	12.830	7.010	31.110
84	16.410	7.410	27.080
96	18.630	7.460	24.740
108	20.790	7.480	24.360
120	20.810	7.910	24.010

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.11 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.040	0.003	97.860
12	1.130	0.016	88.010
24	1.450	0.021	80.430
36	1.420	1.430	78.720
48	7.830	1.910	56.120
60	15.010	2.370	41.037
72	18.830	4.720	32.310
84	20.220	6.950	25.830
96	22.080	7.994	18.760
108	22.124	8.013	10.740
120	22.183	8.115	2.060

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.12 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.040	0.003	98.663
12	0.240	0.018	83.155
24	0.820	1.950	74.599
36	2.070	3.670	61.230
48	5.830	5.420	54.278
60	7.010	5.910	48.396
72	10.130	6.750	27.005
84	14.220	7.820	21.123
96	15.820	9.013	17.380
108	15.910	9.140	9.893
120	15.990	9.256	2.941

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.13 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต20 กรัมต่อลิตร

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.039	0.003	100.267
12	0.180	0.021	81.016
24	0.810	0.083	70.321
36	1.780	0.945	59.626
48	4.880	1.829	44.118
60	8.800	2.310	31.818
72	9.670	4.450	21.123
84	12.500	5.780	16.310
96	16.121	6.170	10.428
108	16.253	9.180	4.011
120	16.470	9.452	2.941

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.14 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 30 กรัมต่อลิตร

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.040	0.004	99.733
12	0.310	0.021	87.877
24	0.980	0.095	71.765
36	1.430	0.415	64.278
48	6.570	2.240	44.652
60	10.440	4.030	37.166
72	14.060	6.590	25.401
84	16.630	7.950	16.845
96	18.003	9.822	9.893
108	18.231	9.970	5.080
120	18.440	10.940	2.941

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.15 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 และความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.038	0.004	100.802
12	0.540	0.037	84.225
24	0.830	0.066	69.786
36	4.760	0.084	58.021
48	8.120	2.880	48.396
60	12.340	4.970	32.888
72	16.050	8.630	18.984
84	18.890	9.170	14.706
96	20.010	12.340	5.080
108	21.150	12.870	2.941
120	21.940	12.910	2.941

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.16 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโจรเจนฟอสเฟต 10 กรัมต่อลิตร

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.043	0.004	99.320
12	1.860	0.039	84.173
24	2.010	0.257	71.573
36	3.120	0.311	67.300
48	8.630	4.560	43.345
60	15.620	8.180	27.482
72	19.310	10.070	13.675
84	20.690	13.340	7.753
96	20.740	13.430	1.727
108	20.960	13.460	1.299
120	20.980	13.510	1.214

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.17 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 4.0 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นโปตัสเซียมไดไฮโจรเจนฟอสเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.040	0.004	100.000
12	2.010	0.210	85.460
24	2.130	0.280	70.330
36	2.070	0.310	54.000
48	12.830	1.020	49.780
60	14.710	6.430	36.040
72	17.420	8.130	21.110
84	19.740	9.410	12.850
96	20.320	11.070	7.430
108	20.450	11.230	4.120
120	20.500	11.280	2.080

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.18 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 แอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และโปตัสเซียมไดไฮโจรเจนฟอสเฟต 30 กรัมต่อลิตร

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.033	0.003	98.773
12	2.430	0.150	83.655
24	2.560	0.230	79.527
36	2.780	0.280	71.218
48	7.010	3.210	52.227
60	12.430	6.720	43.036
72	15.360	8.740	38.209
84	16.300	9.510	21.845
96	20.400	10.340	9.982
108	20.210	10.560	2.091
120	20.240	10.584	2.009

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.19 ผลการทดลองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 แอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และโปตัสเซียมไดไฮโจรเจนฟอสเฟต 40 กรัมต่อลิตร

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.038	0.003	99.400
12	1.450	0.040	81.500
24	1.890	0.049	70.120
36	1.780	0.056	64.300
48	8.430	3.480	34.500
60	14.560	6.430	20.430
72	18.720	8.910	18.770
84	20.110	9.860	10.900
96	20.630	10.020	5.340
108	20.680	10.110	5.120
120	20.740	10.130	5.030

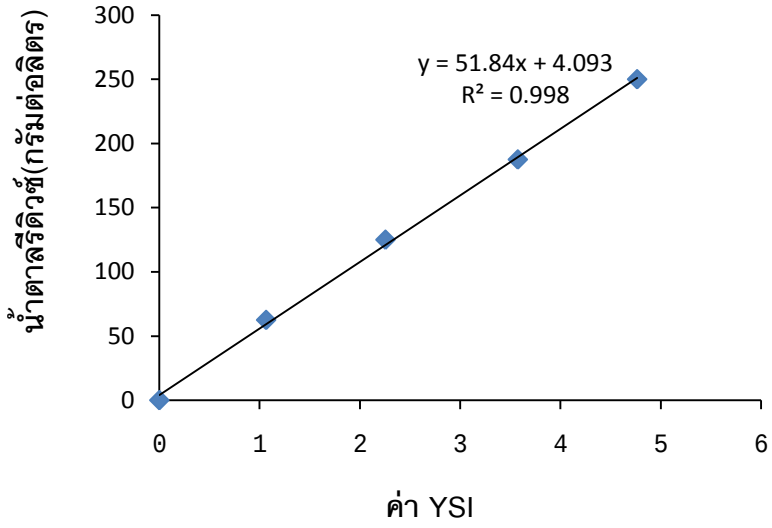
หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง 1.20 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.Glutinis* ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 100 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดเบส 4.0 แอมโมเนียมซัลเฟต 40 กรัมต่อลิตร และโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณไขมัน	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวส์
0	0.049	0.006	102.773
12	0.875	0.014	95.430
24	1.922	0.397	89.023
36	2.436	0.982	85.564
48	7.983	3.143	70.101
60	14.845	5.037	50.442
72	21.243	6.817	20.643
84	23.891	11.491	11.923
96	25.184	16.980	5.436
108	25.267	17.237	0.015
120	25.330	17.872	0.003

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง, ผลิตภัณฑ์ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ง.2 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง



รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ชมพูนุท เพชรทอง เกิดเมื่อวันที่ 4 เมษายน พ.ศ. 2530 ในจังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสตรีนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2548 หลังจากนั้นได้รับปริญญาวิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ เมื่อปี พ.ศ. 2551 และได้ศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2551

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ Chompoonut Phetthong and Chutimon Satirapipathkul, “Lipid production from waste syrup”, RSCE 2010 The 17th Regional Symposium on Chemical Engineering วันที่ 22-23 พฤศจิกายน 2553 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิตติ์ กรุงเทพมหานครฯ ประเทศไทย