

การตัดแยกยีสต์เพื่อผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบอ้อย



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION OF YEAST FOR OIL PRODUCTION FROM SUGARCANE LEAVES HYDROLYSATE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial

Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกยีสต์เพื่อผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบ อ้อย
โดย	นางสาวรัชชา พระนิมิตร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. โสภณ สิริศรัทธา)

รัชนา พระนิมิตร : การคัดแยกยีสต์เพื่อผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบอ้อย (ISOLATION OF YEAST FOR OIL PRODUCTION FROM SUGARCANE LEAVES HYDROLYSATE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ศ. ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา, 90 หน้า.

คัดแยกยีสต์จำนวน 106 ไอโซเลตจากจังหวัดระนอง ประเทศไทย คัดกรองยีสต์ที่สะสมน้ำมันภายในเซลล์สูงโดยการย้อมเซลล์ด้วยสีไนล์เรด (Nile red) พบว่ายีสต์จำนวน 24 ไอโซเลต มีหยดน้ำมันภายในเซลล์มากกว่า 50% ของปริมาตรเซลล์ และเป็นยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ 16 ไอโซเลต น้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลักในไฮโดรไลเสตใบอ้อยเช่นเดียวกับน้ำตาลกลูโคส ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ของยีสต์ 16 ไอโซเลตที่คัดกรองได้ โดยเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลูโคส 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด พบว่าเป็นยีสต์โอลิจินัส (ยีสต์ซึ่งสะสมน้ำมันภายในเซลล์มากกว่า 20% น้ำหนัก/น้ำหนัก ของน้ำหนักแห้งเซลล์) จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Cryptococcus humicola* NG2, *Trichosporon mycotoxinivorans* MG11-12.3, *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2, *Rhodotorula mucilaginosa* MG11-2.3 และ *Yarrowia* sp. NG17 ผลการวิจัยนี้ นับเป็นการรายงานว่ายีสต์ *T. mycotoxinivorans* และ *C. subsufficiens* เป็นยีสต์โอลิจินัสเป็นครั้งแรก แต่เนื่องจากยีสต์ *T. mycotoxinivorans* เป็นยีสต์ก่อโรคจึงไม่นำมาศึกษาต่อ นำยีสต์ 4 สายพันธุ์ที่คัดกรองได้ มาผลิตน้ำมันโดยเลี้ยงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยซึ่งมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 18.7 กรัม/ลิตร และ 19.1 กรัม/ลิตร โดยการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ผ่านการปรับต่างเกนเพื่อจำกัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ และไม่ผ่านการปรับต่างเกน พบว่ายีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตน้ำมันในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ไม่ผ่านการปรับต่างเกนได้มากกว่า โดย *Yarrowia* NG17 ผลิตน้ำมันสูงที่สุดเท่ากับ 10.15% น้ำหนัก/น้ำหนักของน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 โดยแปรผันการเติมและไม่เติม แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) ในไฮโดรไลเสตใบอ้อย พบว่ายีสต์ *Yarrowia* NG17 มีอัตราการผลิตน้ำมันสูงที่สุดเท่ากับ 1.52 กรัม/ลิตร/วัน เมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ไม่เติมสารอาหารใดๆที่ทดสอบ ผลการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นช่วง 5.0-6.5 ของไฮโดรไลเสตใบอ้อย พบว่าที่พีเอช 6.5 *Yarrowia* NG17 ผลิตน้ำมันปริมาณสูงสุดเท่ากับ 25.66% น้ำหนัก/น้ำหนัก ของน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำมันที่ผลิตได้มีกรดโอเลอิกและกรดปาล์มติกเป็นองค์ประกอบหลักเท่ากับ 48.49% และ 22.14% ตามลำดับ ของกรดไขมันทั้งหมด และมีปริมาณกรดปาล์มมิโตเลอิกเพิ่มขึ้นเท่ากับ 11.07% ของกรดไขมันทั้งหมด ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่ายีสต์ *Yarrowia* NG17 สามารถผลิตน้ำมันที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบเหมาะสมสำหรับการนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซลได้สูงที่สุดเท่ากับ 5.64 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยซึ่งไม่ผ่านการปรับต่างเกน ที่พีเอช 6.5

ภาควิชา จุลชีววิทยาลายมือชื่อนิติดี
สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา 2560

5872032023 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: SUGARCANE LEAVES HYDROLYSATE / YARROWIA / OLEAGINOUS YEAST / DETOXIFICATION / DILUTED ACID PRETREATMENT / TWO STAGE FERMENTATION

RATCHANA PRANIMIT: ISOLATION OF YEAST FOR OIL PRODUCTION FROM SUGARCANE LEAVES HYDROLYSATE. ADVISOR: PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D., 90 pp.

One hundred and six yeasts were isolated from Ranong Province, Thailand. High lipid-accumulating yeasts were screened by staining cell with Nile red. There were 24 yeasts had intracellular lipid body larger than 50% of cell volume. And sixteen isolates were able to assimilate xylose which was major sugar component found in sugarcane leave hydrolysate as carbon source for growth. Quantitative analysis of lipid accumulated in the 16 xylose-assimilating yeasts when grown in medium containing 5% (w/v) glucose but low in nitrogen revealed that 5 strains; *Cryptococcus humicola* NG2, *Trichosporon mycotoxinivorans* MG11-12.3, *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2, *Rhodotorula mucilaginosa* MG11-2.3 and *Yarrowia* sp. NG17; were oleaginous (contained lipid more than 20% w/w, dry cell weight). This is the first report of *C. subsufficiens* and *T. mycotoxinivorans* as oleaginous yeast. The *T. mycotoxinivorans* MG11-12.3 was not further studied due to its pathogenicity. Lipid production of the 4 oleaginous yeasts isolated was determined by culturing in sugarcane leave hydrolysate obtained after cellulase hydrolysis of dilute sulfuric acid pretreated sugarcane leave. The sugarcane leave hydrolysate contained glucose and xylose at 18.7 g/L and 19.1 g/L, respectively. Comparison between the sugarcane leave hydrolysate which was alkaline precipitated to detoxify yeast growth inhibitor (DSLH) and was not alkaline precipitated (NSLH), it was found that the 4 oleaginous yeasts accumulated higher lipid in the NSLH. *Yarrowia* NG17 accumulated the highest lipid (10.15% w/w, dry cell weight). An optimal condition for lipid accumulation of *Yarrowia* NG17 in NSLH was determined by adding or not adding of CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄ and at various initial pH (5.0-6.5). The *Yarrowia* NG17 had the highest lipid productivity (1.52 g/L/day) in NSLH without any supplementation and highest lipid content (25.66% w/w, dry cell weight) at initial pH 6.5. Major fatty acids composition of *Yarrowia* NG17 lipid were oleic acid (C18:1) and palmitic acid (C16:0) at 48.49% and 22.14%, respectively and palmitoleic acid content was increased to 11.07%. Based on this study, *Yarrowia* NG17 accumulated the highest lipid (5.64 g/L) which had fatty acid composition suitable for biodiesel production when grown in the NSLH without any supplementation at pH 6.5.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Microbial Technology Advisor's Signature

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ท่านให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ กำลังใจ ตลอดจนช่วยแก้ไขข้อบกพร่องทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. โสภณ สิริศรัทธา ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำเพื่อปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคที่ 3 (ศอภ.3) จังหวัดชลบุรี สำหรับความอนุเคราะห์ให้อ้อยที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช ทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุนอุดหนุนการวิจัย 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ขอบคุณครอบครัว เพื่อนสมาชิกห้องวิจัย 1805/15 และเพื่อนนิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับกำลังใจ กำลังกาย ซึ่งเป็นอีกแรงผลักดันสำคัญให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 แนวคิด ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมุติฐาน.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
2.1 ไบโอดีเซล	4
2.2 น้ำมันจุลินทรีย์.....	4
2.3 ยีสต์โอลิจินัส	6
2.4 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์โอลิจินัส	9
2.4.1 การสังเคราะห์กรดไขมัน.....	9
2.4.2 การสังเคราะห์ไขมันของยีสต์โอลิจินัส	12
2.5 ลิกโนเซลลูโลสไฮโดรไลสเสตเพื่อการผลิตน้ำมันด้วยยีสต์โอลิจินัส	13
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำมัน.....	18
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	20
3.1 ใบบ่อย	20

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	20
3.3 สารเคมี.....	22
3.4 จุลินทรีย์	24
3.5 วิธีการ.....	24
3.5.1 การคัดแยกยีสต์โอลิจินัส.....	24
3.5.1.1 การคัดแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติพื้นที่จังหวัดระนอง.....	24
3.5.1.2 การตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์เบื้องต้น	24
3.5.1.3 การคัดกรองยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลส	25
3.5.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์.....	25
3.5.2 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	26
3.5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (Endoh และคณะ, 2008).....	26
3.5.2.2 การจัดกลุ่มเชื้อด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR fingerprinting) (Endoh และคณะ, 2011).....	27
3.5.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 บนยีน 26S rDNA (Endoh และคณะ, 2008).....	28
3.5.2.4 การสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)	29
3.5.3 การเตรียมไฮโดรไลเสตไบอ้อย (รูปที่ 3 - 3).....	29
3.5.4 การผลิตน้ำมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตไบอ้อย.....	30
3.5.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (first stage).....	30
3.5.4.2 การผลิตไขมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตไบอ้อย (second stage)	30
3.5.4.3 หาภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตไบอ้อย.....	31
3.5.5 วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่เตรียมได้	31
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....	32

4.1 ผลการคัดแยกและจัดจำแนกชนิดยีสต์โดยหลักอนุกรมวิธานโมเลกุลและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ.....	32
4.1.1 ผลการคัดแยกและจัดจำแนกชนิดยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติพื้นที่จังหวัดระนอง.....	32
4.2 ผลการคัดกรองยีสต์สะสมน้ำมันภายในเซลล์.....	46
4.3 ผลการคัดกรองยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญ.....	51
4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์.....	52
4.5 ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันยีสต์ที่เตรียมได้.....	59
4.6 ผลการเตรียมไฮโดรไลเสตไบอ้อย.....	61
4.7 ผลการผลิตน้ำมันของยีสต์โอลิจินัสจากไฮโดรไลเสตไบอ้อย.....	62
4.8 ผลการหาภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์ <i>Yarrowia</i> NG17 จากไฮโดรไลเสตไบอ้อย.....	65
4.8.1 ผลของการเติม แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) หรือแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) ลงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยต่อการผลิตน้ำมันของ <i>Yarrowia</i> NG17	65
4.8.2 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของ <i>Yarrowia</i> NG17 ในไฮโดรไลเสตไบอ้อย	68
4.9 ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมัน <i>Yarrowia</i> NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5.....	71
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	75
.....	78
รายการอ้างอิง	78
ภาคผนวก.....	84
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ	85
ภาคผนวก ข. สารเคมี	87

ญ

หน้า

ภาคผนวก ค. กราฟมาตรฐาน88

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์90



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2 - 1 ข้อดีและข้อด้อยของแหล่งที่ใช้ผลิตัวถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล (Huang และคณะ, 2010).....	5
ตารางที่ 2 - 2 ปริมาณน้ำมันและองค์ประกอบของไขมันจากน้ำมันสำหรับรายขนาดเล็ก ยีสต์ และพืชไขมัน (Thevenieau และ Nicaud, 2013; Ohse และคณะ, 2015).....	6
ตารางที่ 2 - 3 เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันของยีสต์โอลิจินัสในภาวะต่างๆ (Ageitos และคณะ, 2011).....	8
ตารางที่ 2 - 4 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และความทนทานต่อสารยับยั้งการเจริญของยีสต์น้ำมัน (Sitepu และคณะ, 2014).....	17
ตารางที่ 4 - 1 ตัวอย่างจากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1	35
ตารางที่ 4 - 2 ตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11	36
ตารางที่ 4 - 3 ตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว.....	37
ตารางที่ 4 - 4 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1	38
ตารางที่ 4 - 5 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11	38
ตารางที่ 4 - 6 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว	40
ตารางที่ 4 - 7 แสดงลักษณะลึพิตบอดีโนเซลล์ที่ย้อมติดสีในลรัเรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	47
ตารางที่ 4 - 8 ปริมาณการผลิตน้ำมันของยีสต์ตามลำดับอนุกรมวิธาน.....	57
ตารางที่ 4 - 9 องค์ประกอบของไบอ้อย	61
ตารางที่ 4 - 10 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส ไนโตรเจน และสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ในไฮโดรไลเสตไบอ้อย	62

สารบัญภาพ

รูปที่ 2 - 1 กระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน	4
รูปที่ 2 - 2 ลิพิดบอดีในเซลล์ของ <i>Cryptococcus curvatus</i> ถ่ายโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	7
รูปที่ 2 - 3 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์โอลิจินัส	11
รูปที่ 2 - 4 การสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง โดย FAS คือ เอนไซม์ Fatty acid synthase 9	11
รูปที่ 2 - 5 เปรียบเทียบกระบวนการสังเคราะห์ acetyl-CoA ของ <i>S. cerevisiae</i> และ <i>Y. lipolytica</i> เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน	12
รูปที่ 2 - 6 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์	13
รูปที่ 2 - 7 โครงสร้างของลิกลินเซลลูโลส	15
รูปที่ 2 - 8 น้ำตาลและสารยับยั้งการเจริญที่ได้จากการปรับสภาพโครงสร้างของลิกลินเซลลูโลส	16
รูปที่ 3 - 1 ไร้อ้อย	20
รูปที่ 3 - 2 แผนผังการผลิตน้ำมันด้วยวิธี two stage fermentation	26
รูปที่ 3 - 3 แผนผังการเตรียมไฮโดรไลเสตไบอ้อย	30
รูปที่ 4 - 1 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ที่คัดแยกได้	34
รูปที่ 4 - 2 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากการของ <i>Candida</i> MG11-13.3	42
รูปที่ 4 - 3 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการของ <i>Kurtzmaniella</i> NG4.3, NG5 และ NG6	43
รูปที่ 4 - 4 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการของ <i>Wickerhamomyces</i> NG10 และ NG12	44
รูปที่ 4 - 5 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากของ <i>Yarrowia</i> NG12 ก้	45
รูปที่ 4 - 6 แสดงการเจริญของยีสต์บนอาหารไซโลส	52
รูปที่ 4 - 7 การผลิตน้ำมันของ <i>C. tropicalis</i> สายพันธุ์ NG21 MG1-8 MG11-4.1 MG11-8.2 MG11-17.3 MG11-4w.2 MG11-20w.2 MG11-20w.4 และ <i>C. orthopsisiosis</i> MG11-11.3	55

รูปที่ 4 - 8 การผลิตน้ำมันของ *Cry. laurentii* NG22, *Cry. humicola* NG2, *T. mycotoxinivorans* สายพันธุ์ NG4.1, MG11-12.3, *Cyb. subsufficiens* NG8.2, *R. mucilaginoso* MG11-2.3 และ *Yarrowia* NG17.....56

รูปที่ 4 - 9 ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์โอลิจินัสที่คัดกรองได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร High C/N.....60

รูปที่ 4 - 10 ปริมาณน้ำมัน (lipid content) ที่ยีสต์ผลิตเมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ไม่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (NDSLH) และในไฮโดรไลเสตที่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (DSLH).....64

รูปที่ 4 - 11 ปริมาณเซลล์ (biomass) ยีสต์ผลิตเมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ไม่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (NDSLH) และในไฮโดรไลเสตที่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (DSLH).....64

รูปที่ 4 - 12 ผลผลิตน้ำมัน (lipid yield) ยีสต์ผลิตเมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ไม่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (NDSLH) และในไฮโดรไลเสตที่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (DSLH).....65

รูปที่ 4 - 13 ผลของการเติม KH_2PO_4 , $CaCl_2$ หรือ $MgSO_4$ รวมกัน 3 ชนิด หรือ 2 ชนิด ลงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยต่อการผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของ *Yarrowia* NG1767

รูปที่ 4 - 14 ผลของการเติม KH_2PO_4 , $CaCl_2$ หรือ $MgSO_4$ รวมกัน 3 ชนิด หรือ 2 ชนิด ลงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยต่อการเจริญของ *Yarrowia* NG1768

รูปที่ 4 - 15 ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ของ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่างๆ69

รูปที่ 4 - 16 ปริมาณเซลล์ของ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่างๆ.....69

รูปที่ 4 - 17 รูปแบบการผลิตน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5.....70

รูปที่ 4 - 18 เปรียบเทียบชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่มีพีเอช 6.5 และอาหาร High C/N.....72

- รูปที่ ค - 1 กราฟมาตรฐานของเฟอร์ฟูรัลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC88
- รูปที่ ค - 2 กราฟมาตรฐานของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC89



บทที่ 1 บทนำ

1.1 แนวคิด ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมุติฐาน

การพัฒนาทางเศรษฐกิจอย่างก้าวกระโดดและการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรโลก ส่งผลให้ความต้องการพลังงานเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย น้ำมันปิโตรเลียมเป็นพลังงานหลักที่ใช้ในปัจจุบัน เมื่อเกิดการเผาไหม้ของน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมจะมีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจัดเป็นแก๊สเรือนกระจก และแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาฝนกรด ทำให้ค่าพีเอชของดินลดลง ก่อให้เกิดผลเสียต่อภาคการเกษตร นอกจากนี้ยังปลดปล่อยฝุ่นละอองก่อให้เกิดมลภาวะทางอากาศ ในขณะที่ไบโอดีเซลซึ่งมีสมบัติทางกายภาพคล้ายกับน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม ผลิตโดยการนำน้ำมันจากพืชหรือจากสัตว์มาผ่านกระบวนการ trans-esterification ซึ่งการเผาไหม้ปลดปล่อยแก๊สและฝุ่นละอองในปริมาณที่ต่ำกว่าการเผาไหม้น้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมมาก (Demshemino และคณะ, 2013) ดังนั้นความต้องการไบโอดีเซลจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ประมาณ 307,000 บาร์เรล/วัน ภายในระยะเวลาเพียง 6 ปี (ค.ศ. 2006-2012) (U.S. Energy Information Administration) ซึ่งการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชอาหารอาจทำให้เกิดการขาดแคลนอาหารส่งผลให้พืชอาหารมีราคาสูงขึ้น จึงได้มีการศึกษาการนำน้ำมันจากจุลินทรีย์ซึ่งมีอัตราการผลิตน้ำมันสูงกว่าน้ำมันจากพืชถึง 100 เท่า (ลิตร/เฮกตาร์/ปี) (Atabani และคณะ, 2012) มาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลแทน

ยีสต์โอลิจินัส คือ ยีสต์ที่สะสมไขมันไว้ในเซลล์มากกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนักเซลล์แห้ง) ปี ค.ศ. 2011 Kitcha และ Cheirslip ได้รายงานว่ายีสต์ *Lipomyces* sp., *Rhodosporidium* sp. และ *Rhodotorula* sp. สามารถสะสมไขมันในเซลล์ได้มากถึง 70% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) โดยส่วนใหญ่อยู่ในรูป triacylglycerols (TAG) (Sitepu และคณะ, 2014) ซึ่งคล้ายกับน้ำมันจากพืช การผลิตน้ำมันจากยีสต์มีข้อดีคือการผลิตน้ำมันจากพืชเนื่องจากไม่ต้องการพื้นที่เพาะปลูก เจริญรวดเร็ว ไม่มีข้อจำกัดด้านสภาพภูมิอากาศหรือฤดูกาล และสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด รวมทั้งน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่พบได้ทั่วไปในผนังเซลล์ของพืช ปี ค.ศ. 2011 Tsigie และคณะ รายงานว่า *Yarrowia lipolytica* สามารถผลิตน้ำมันเมื่อเจริญในไฮโดรไลเสตของชานอ้อย ปี ค.ศ. 2014 Gao และคณะ รายงานการผลิตน้ำมันจาก *Trichosporon cutaneum* จากไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพด Sitepu และคณะ (2014) รายงานการผลิตน้ำมันจาก *Cryptococcus humicola* จากไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยเส้นใยข้าวโพด ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการสะสมไขมันในเซลล์ของยีสต์คือ อัตราส่วนของคาร์บอน/ไนโตรเจนที่ได้รับ เมื่อไนโตรเจนถูกใช้หมด เซลล์จึงจะถูกชักนำให้สะสมไขมัน (Sitepu, 2014) Beopoulos และคณะ (2009) รายงานว่าเมื่ออัตราส่วนของคาร์บอน/ไนโตรเจนในอาหารเพิ่มขึ้นจาก 150 เป็น 350 *Y. lipolytica*

จะสะสมไขมันเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นชนิดของแหล่งไนโตรเจนยังส่งผลต่อการสะสมไขมันด้วยเช่นกัน Evans และ Ratledge (1984) รายงานว่าการให้ไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ทำให้ยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* สะสมไขมันมากขึ้น Chen และคณะ (2013) รายงานว่าการเติมไนโตรเจนอินทรีย์ลงในไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดไม่ทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ *T. cutaneum* ที่เจริญอยู่เพิ่มขึ้นเนื่องจากมีไนโตรเจนอยู่แล้วในไฮโดรไลเสต แต่การแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิการบ่ม พีเอช และการเติม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ และ KCl ทำให้ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น

ประเทศไทยส่งออกน้ำตาลจากอ้อยเป็นอันดับ 2 ของโลก รองจากบราซิล อ้อยเป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตน้ำตาล ปีการผลิต 2558/59 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 11 ล้านไร่ มีผลผลิตอ้อย 100 ล้านตัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย 2559) เนื่องจากหลังการเก็บเกี่ยวอ้อยจะมีใบอ้อยเหลืออยู่ในพื้นที่ประมาณ 250 กิโลกรัม/ตัน/ไร่ ซึ่งจะถูกกำจัดด้วยการเผาทำลาย (Gullett และคณะ, 2006) จึงก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางอากาศส่งผลเสียต่อระบบทางเดินหายใจ (Cancado และคณะ, 2006) จึงได้มีการศึกษาวิธีการนำใบอ้อยไปใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าใบอ้อยเป็นสารประกอบประเภทลิโกลิโนเซลลูโลส ประกอบด้วยพอลิเมอร์หลัก 3 ชนิด คือ 1) เซลลูโลส ฮอมอพอลิเมอร์ของกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายตรงด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก 2) เฮมิเซลลูโลส เฮเทอโรโพลิเมอร์ของน้ำตาลหลายชนิดผสมกัน เช่น น้ำตาลกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส เป็นต้น ในรูปของพอลิเมอร์ไซแลน แมนแนน กาแลกแตน และอะราบิแนน (Bastawde, 1992) โดยมีไซแลนที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบเป็นโครงสร้างหลัก (ร้อยละ 85-93, (Browning, 1967)) 3) ลิกนิน เฮเทอโรโพลิเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติก (Cheng และคณะ, 2008) ทำหน้าที่ห่อหุ้มเส้นใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ป้องกันการย่อยสลายโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นการที่จะย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในใบอ้อยให้เป็นน้ำตาลหน่วยย่อยเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ จึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพก่อน ปี ค.ศ. 2012 Jutakanoke และคณะรายงานวาลิโกลิโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบในใบอ้อยพันธุ์ *Saccharum officinarum* ประกอบด้วย เซลลูโลส 38.5% เฮมิเซลลูโลส 23% และลิกนิน 15.6% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) หลังการปรับสภาพใบอ้อยปริมาณ 6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ได้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสในไฮโดรไลเสต 9.0 กรัม/ลิตร และ 0.62 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำใบอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาย่อยด้วยเซลลูเลส 160 FPU/กรัม ของน้ำหนักแห้ง นาน 6 ชั่วโมง ได้น้ำตาลกลูโคส 9.8 กรัม/ลิตร

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกยีสต์และหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบอ้อยซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางที่ภาวะเหมาะสม ร่วมกับเซลลูเลส และวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันที่เตรียมได้

1.2 วัตถุประสงค์

คัดกรองอีสต์โพลีจีนัสและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตไบอ้อยเพื่อการผลิตไบโอดีเซล

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 คัดกรองอีสต์โพลีจีนัส
- 1.3.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของอีสต์ที่คัดแยกได้
- 1.3.3 ผลิตน้ำมันของอีสต์ที่คัดกรองได้จากไฮโดรไลเสตไบอ้อย
- 1.3.4 วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันอีสต์ที่ผลิตได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

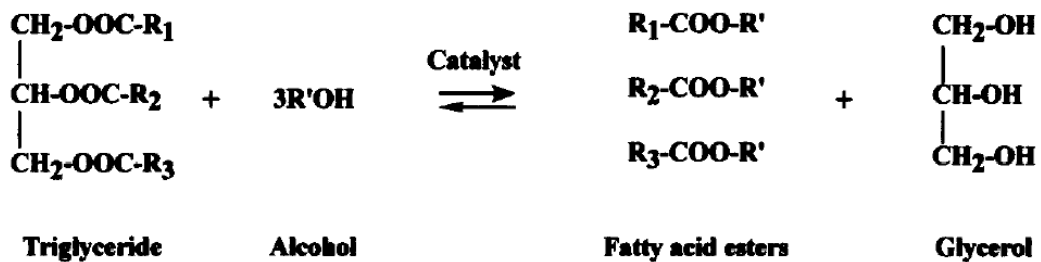
ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันของอีสต์ที่คัดกรองได้เมื่อใช้ไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยไบอ้อยเป็นวัตถุดิบ

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ไบโอดีเซล

การผันผวนของราคาน้ำมันในตลาดโลกเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีการศึกษาถึงแหล่งพลังงานเพื่อนำมาทดแทนน้ำมันดีเซล เริ่มจากการใช้น้ำมันจากพืชหรือจากไขมันสัตว์เดิมในเครื่องยนต์ดีเซลโดยตรง ทำให้เกิดปัญหาต่างๆ เช่น ความหนืดของน้ำมัน การจับตัวเป็นก้อน การเผาไหม้ เป็นต้น หลังจากนั้นจึงได้มีการปรับปรุงคุณภาพของไบโอดีเซล โดยนำน้ำมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์ (triglyceride) ไปผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งน้ำมันที่ได้สามารถใช้ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล (Clark และคณะ, 1984)

ไบโอดีเซล คือ เอสเตอร์ของกรดไขมันจากพืช จากสัตว์ หรือจากจุลินทรีย์ ที่ผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) เป็นกรด ต่างหรือเอนไซม์ ซึ่งเอสเตอร์ที่ได้แบ่งตามชนิดของแอลกอฮอล์ (alcohol) ที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl ester: FAME) หรือเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid ethyl ester: FAEE) และมีกลีเซอรอล (glycerol) เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการ แสดงดังรูปที่ 2 - 1



รูปที่ 2 - 1 กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Fukuda และคณะ, 2001)

2.2 น้ำมันจุลินทรีย์

ยุคเริ่มต้นของการผลิตไบโอดีเซลใช้วัตถุดิบเป็นน้ำมันที่บริโภคได้ (edible oil) ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันจากเมล็ดแรมพ์ (rapeseed oil) น้ำมันปาล์ม น้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน เมื่อต้องการผลิตในปริมาณมากจะส่งผลให้ราคาพืชอาหารที่สูงขึ้น การผลิตไบโอดีเซลในยุคที่ 2 จึงเป็นวัตถุดิบกลุ่มน้ำมันที่บริโภคไม่ได้ (non-edible oil) หรือไม่ใช่พืชอาหาร (non-food feedstocks) เช่น สนูปู่ดำ (jatropha) น้ำมันโจโจบา (jojoba oil) ข้อดีของวัตถุดิบกลุ่มนี้คือการไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณ

พืชอาหาร นอกจากนั้นน้ำมันพืชใช้แล้วยังเป็นอีกวัตถุดิบหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เพราะต้นทุนมีราคาถูกที่สุดเมื่อเทียบกับพืชน้ำมัน (Haas, 2005) แต่มีข้อเสียคือน้ำมันใช้แล้วมีกรดไขมันอิ่มตัวอยู่ปริมาณมากซึ่งยากต่อการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล การผลิตไบโอดีเซลในยุคที่ 3 วัตถุดิบเป็นกลุ่มน้ำมันจากจุลินทรีย์ (microbial oil) เรียกว่า จุลินทรีย์โอเลอิจินัส (oleaginous microorganism) ซึ่งสะสมไขมันภายในเซลล์ได้มากกว่า 20% (น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เช่น แบคทีเรียโอเลอิจินัส (oleaginous bacteria) ยีสต์โอเลอิจินัส (oleaginous yeast) สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เป็นต้น ซึ่งมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2 - 1 น้ำมันจากพืชที่นิยมนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซล เช่น น้ำมันเมล็ดเรพ น้ำมันดอกทานตะวัน เป็นต้น และน้ำมันจากจุลินทรีย์ มีปริมาณและส่วนประกอบของชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันคล้ายกันคือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid; C16:0) กรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) และกรดลิโนเลอิก (linoleic acid; C18:2) ดังแสดงในตารางที่ 2 - 1 น้ำมันจากจุลินทรีย์จึงสามารถทดแทนน้ำมันจากพืชได้

ตารางที่ 2 - 1 ข้อดีและข้อด้อยของแหล่งที่ใช้ผลิตวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล (Huang และคณะ, 2010)

แหล่งน้ำมัน	ข้อดี	ข้อด้อย
สาหร่ายขนาดเล็ก	1) มีกรดไขมันเหมือนกับน้ำมันพืช 2) เมื่อเพาะเลี้ยงในภาวะเหมาะสมจะสะสมน้ำมันสูงถึง 85% 3) ระยะเวลาเพาะเลี้ยงสั้นกว่าพืช	1) น้ำมันสาหร่ายส่วนใหญ่ค่าพลังงานต่ำกว่าเชื้อเพลิงดีเซล 2) ต้นทุนการเพาะเลี้ยงสูงเมื่อเทียบกับพืชน้ำมัน
แบคทีเรีย	1) ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงสั้นที่สุด	1) ไขมันที่สะสมภายในเซลล์ไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตไบโอดีเซล
ยีสต์	1) มีหลากหลายสายพันธุ์ในธรรมชาติ 2) เมื่อเพาะเลี้ยงในภาวะเหมาะสมจะสะสมน้ำมันสูงถึง 70% 3) ระยะเวลาเพาะเลี้ยงสั้นกว่าสาหร่ายขนาดเล็ก 4) ใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย	1) ต้องหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสมน้ำมันในเซลล์ 2) วิธีสกัดน้ำมันยุ่งยากมากกว่าและต้องพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ 3) ต้นทุนการเพาะเลี้ยงสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมัน
น้ำมันพืชใช้แล้ว	1) ราคาถูกเมื่อเทียบกับพืชน้ำมัน	1) ปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวสูงทำให้ยากต่อการผลิตไบโอดีเซล

ตารางที่ 2 - 2 ปริมาณน้ำมันและองค์ประกอบของไขมันจากน้ำมันสาหร่ายขนาดเล็ก ยีสต์ และพืช
น้ำมัน (Thevenieau และ Nicaud, 2013; Ohse และคณะ, 2015)

แหล่งน้ำมัน	ปริมาณน้ำมัน (%)	ร้อยละของกรดไขมันที่พบ					
		กรดปาล์มติก (C16:0)	กรดปาล์มโทเตลิก (C16:1)	กรดสเตียริก (C18:0)	กรดโอเลอิก (C18:1)	กรดลิโนเลอิก (C18:2)	กรดลิโนเลนิก (C18:3)
สาหร่ายขนาดเล็ก							
<i>Chlorella zofingiensis</i>	28-32	23	2	2	36	18	8
<i>Tetraselmis suecica</i>	23	27	6	13	25	2	15
ยีสต์							
<i>Cryptococcus albidus</i>	60	12	1	3	73	12	-
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63	34	6	5	51	3	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	11	6	1	28	51	-
พืชน้ำมัน							
น้ำมันทานตะวัน	45	7	-	5	19	68	1
น้ำมันถั่วเหลือง	20	11	-	4	24	54	7
น้ำมันเมล็ดแรมพ์	45	4	-	2	62	22	10

2.3 ยีสต์โอลิจินัส

โดยทั่วไปยีสต์สามารถสังเคราะห์ไขมันเก็บไว้ภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของเซลล์โดยมีปริมาณไขมัน 5-10% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Ageitos และคณะ, 2011) แต่ยีสต์โอลิจินัส คือ ยีสต์ที่สะสมไขมันไว้ภายในเซลล์มากกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์โอลิจินัสเริ่มสะสมไขมันเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเกินพอ และจำกัดปริมาณสารอาหารอื่นๆที่มีผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์จุลินทรีย์โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจน (Boulton และ Ratledge, 1984) เมื่อไนโตรเจนหมดยีสต์โอลิจินัสจะหยุดการเพิ่มจำนวนของเซลล์และเปลี่ยนคาร์บอนเป็นไขมันแล้วเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ในรูปลิพิดบอดี (lipid bodies) ภายในเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2 - 2 ยีสต์โอลิจินัสบางสายพันธุ์สามารถสะสมไขมันมากถึง 70% ของน้ำหนัก

เซลล์ เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์กลุ่มที่ไม่ใช่ยีสต์โอลิจินัส (nonoleaginous yeast) ในอาหารที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน พบว่ายีสต์เหล่านั้นไม่หยุดการแบ่งเซลล์ และมีการสะสมแหล่งพลังงานสำรองในรูปของคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูแคน (glucans) แมนแนน (mannans) เป็นต้น เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันภายในเซลล์พบว่ามีน้อยกว่า 10% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Ratledge, 2004) 95% ของไขมันยีสต์โอลิจินัสเป็นไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol: TAG) ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันจากเมล็ดพืช จึงเชื่อว่ามีศักยภาพสูงสำหรับการพัฒนาการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ (Sitepu และคณะ, 2014) โดยทั่วไปพบยีสต์โอลิจินัสอยู่ในยีสต์ *Cryptococcus*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces* และ *Rhodotorula* ซึ่งการผลิตน้ำมันมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ รวมไปถึงแหล่งวัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงก็เป็นปัจจัยในการทำให้การสะสมและการผลิตไขมันของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไปด้วย (Huang และคณะ, 2009) ดังแสดงในตารางที่ 2 - 3



รูปที่ 2 - 2 ลิพิดบอดีในเซลล์ของ *Cryptococcus curvatus* ถ่ายโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Holdsworth และคณะ, 1988)

ยีสต์โอลิจินัส สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน ในน้ำ ในส่วนต่างๆของพืช เศษใบไม้ที่มีการย่อยสลาย รวมถึงบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน Kitcha และ Cheirsilp (2011) คัดแยกยีสต์โอลิจินัส *T. spathulata* และ *K. ohmeri* จากของเสียในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม Srisuwan และคณะ (2016) คัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 67 ไอโซเลต จากดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้ที่เก็บมาจากดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเป็นยีสต์โอลิจินัสเพียง 2 ไอโซเลต คือ *Rhodotorula C7* และ *Rhodospiridium paludigenum C10* ยีสต์ที่มีการศึกษาแล้วจำนวน 1,600 สปีชีส์ (known species) มีเพียง 70 สปีชีส์ ที่มีการรายงานว่าเป็นยีสต์โอลิจินัส (Garay และคณะ, 2016) ประเทศไทยตั้งอยู่ในแนวเส้นศูนย์สูตร ภูมิอากาศร้อนชื้น เหมาะสมต่อการเจริญของพืชและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะคัดแยกยีสต์โอลิจินัสที่มีประสิทธิภาพสูงจากธรรมชาติได้ เพื่อนำไปใช้ผลิตไบโอดีเซลต่อไป

ตารางที่ 2 - 3 เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันของยีสต์โอลิจิโนสในภาวะต่างๆ (Ageitos และคณะ, 2011)

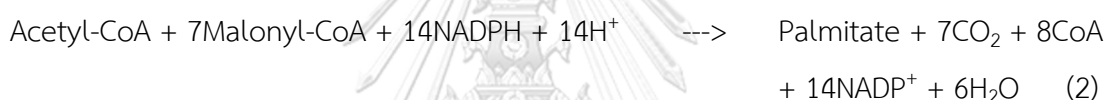
สายพันธุ์ยีสต์	น้ำหนักแห้ง (ก./ล.)	ปริมาณไขมัน (% น้ำหนักแห้ง)	อุณหภูมิ (°ซ)	ระยะเวลา (ชม.)	pH	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	ภาชนะเลี้ยง
<i>Apiotrichum curvatum</i> ATCC20509	15.11	47	32	145	5.5	แล็กโทส	MM	f
<i>Cryptococcus terricola</i>	16	39	25	184	5.5	กลูโคส	MM	F
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70295	9.3	72.3	30	220	5	กลูโคส	น้ำตาล	f
<i>L. starkeyi</i> AS 2. 1390	18	30	28	96	5.8	กลูโคส	MM	f
	20.9	20.5	28	96	5.8	ไซโตส	MM	f
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	18.2	76.1	30	120	6	กลูโคส	MmM	f
<i>R. toruloides</i> AS 2. 1389	6.9	42	28	96	5.8	กลูโคส	MM	f
	7.2	26.8	28	96	5.8	ไซโตส	MM	f
<i>Rhodotorula gracilis</i> CFR-1	13.7	59.4	-	-	5	โมลาส	MmM	SF
<i>R. minuta</i> IIP-33	15	48	30	80	4.5	กลูโคส	MmM	F F-b
<i>Yarrowia lipolytica</i> LGAMS(7)1	8.7	40	28	240	6	กลีเซอรอล	MM	F
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 50109	15	44	28	120	6	ไขมันสัตว์	MM	F

MnM: mineral medium, MM: minimal medium, F: fermentor, f: flask, F-b: fed-batch, SF: solid fermentation

2.4 กลไกการสังเคราะห์ไขมันของยีสต์โฮลิจินัส

2.4.1 การสังเคราะห์กรดไขมัน

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันของยีสต์โฮลิจินัส แบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนหลักคือ กระบวนการ condensation เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) มี acetyl-CoA (Ac-CoA), malonyl-CoA (Mal-CoA) และ NADPH เป็นสารตั้งต้น โดย malonyl-CoA สังเคราะห์มาจาก acetyl-CoA ดังแสดงในสมการที่ (1) และมีเอนไซม์ Fatty acid synthase ซึ่งประกอบไปด้วย เอนไซม์ 7 หน่วยย่อย ทำหน้าที่เติม malonyl-CoA ครั้งละ 1 โมเลกุล เข้ากับ acetyl-CoA จนได้ palmitate (C16:0) ดังแสดงในสมการที่ (2) ผลรวมของสมการเคมีการสังเคราะห์ palmitate ดังแสดงในสมการที่ (3)



ขั้นตอนที่ 2 คือกระบวนการเพิ่มจำนวนอะตอมของคาร์บอน (elongation) และกระบวนการเพิ่มพันธะคู่ในกรดไขมัน (desaturation) เกิดขึ้นในร่างแหเอนโดพลาสซึมชนิดขรุขระ (Rough endoplasmic reticulum; RER) โดยเอนไซม์ elongases และ desaturases ทำให้ได้เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2 - 3 และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2 - 4 จากสมการข้างต้นปริมาณ acetyl-CoA, malonyl-CoA และ NADPH จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมันของยีสต์ ในภาวะปกติ acetyl-CoA จะสะสมอยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เพื่อใช้ในวัฏจักร TCA (tricarboxylic acid cycle) สำหรับสร้างพลังงานในรูปของ ATP ให้กับเซลล์ เมื่อยีสต์โฮลิจินัสอยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปแต่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด ทำให้สาร AMP (adenosine monophosphate) ถูกดึงหมู่แอมโมเนียออกมาเพื่อใช้ในเซลล์ โดยเอนไซม์ AMP deaminase (Ratledge, 1991; Ratledge, 2004) ดังสมการที่ (4) ปริมาณของ AMP ที่ลดลงส่งผลต่อปริมาณของ ADP (adenosine diphosphate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการ

สังเคราะห์ ATP ของเซลล์ ทำให้เซลล์ของยีสต์โอลิจินัสหยุดการเพิ่มจำนวนและเริ่มกระบวนการการสะสมไขมัน



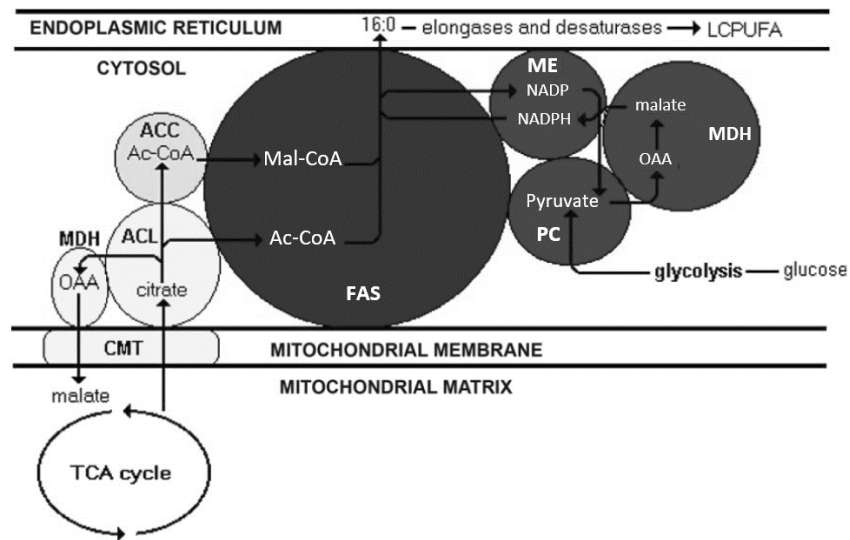
ผลจากวัฏจักร TCA ที่หยุดลงทำให้เกิดการสะสมของ citrate ภายในเซลล์มากขึ้น เอนไซม์ citrate/malate translocase (CMT) ที่ผนังไมโทคอนเดรียจะทำหน้าที่ส่ง citrate ออกและรับ malate เข้ามาในไมโทคอนเดรีย จากนั้น citrate จะถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate (OAA) โดยเอนไซม์ ATP:citrate lyase (ACL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะยีสต์โอลิจินัส (Boulton และ Ratledge, 1981; Ratledge, 2004) ดังสมการที่ (5)



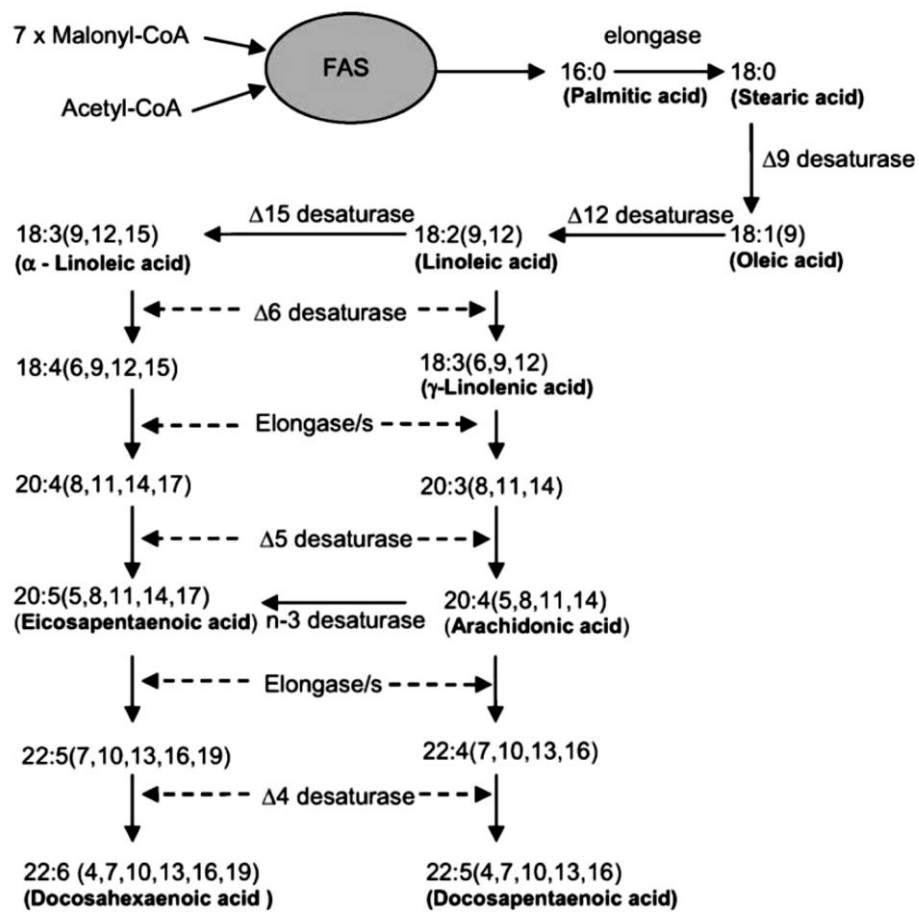
Oxaloacetate ถูกเปลี่ยนเป็น malate โดยเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH) ซึ่งจะถูกนำไปสร้าง NADPH โดย malic enzyme (ME) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะในยีสต์โอลิจินัส ดังแสดงในสมการที่ (6)



กล่าวโดยสรุปคือ เอนไซม์ที่พบเฉพาะในยีสต์โอลิจินัส คือ ATP:citrate lyase (ACL) และ malic enzyme ทำหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์ acetyl-CoA และ NADPH ตามลำดับ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดไขมันทำให้ยีสต์โอลิจินัสสามารถสะสมไขมันในเซลล์เป็นจำนวนมาก

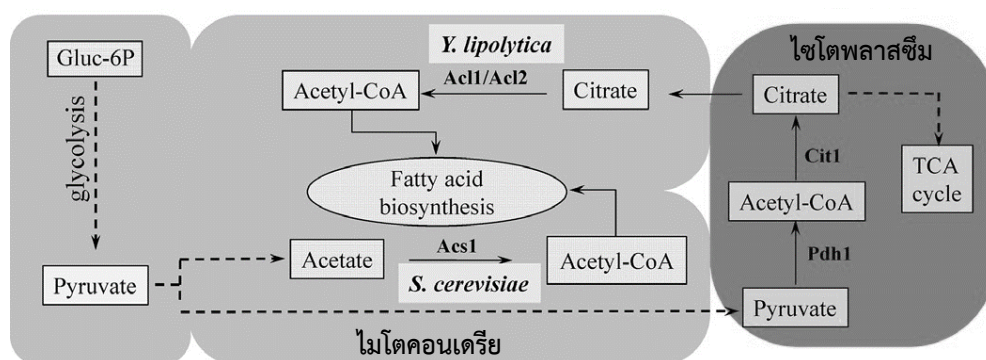


รูปที่ 2 - 3 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันในยีสต์โอลิจินัส (Ratledge และ Wynn, 2002)



รูปที่ 2 - 4 การสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง โดย FAS คือ เอนไซม์ Fatty acid synthase 9 (Ratledge, 2004)

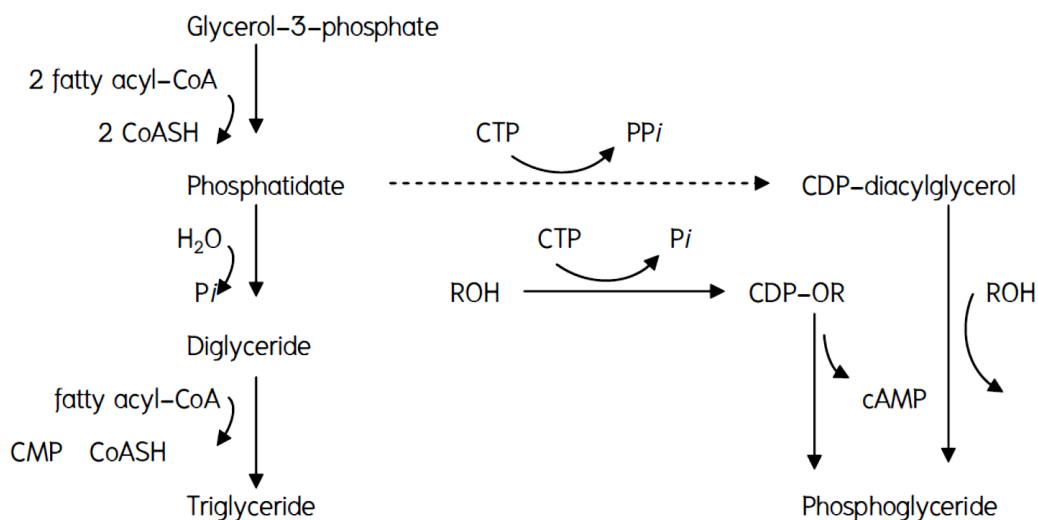
Fakas (2017) ทำการเปรียบเทียบขั้นตอนที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันระหว่างยีสต์โอลิจินัสคือ *Y. lipolytica* และยีสต์ที่ไม่ใช่โอลิจินัสคือ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า *S. cerevisiae* สังเคราะห์ acetyl-CoA จาก acetate ที่ได้จากกระบวนการ glycolysis ในไซโตพลาสซึมด้วยเอนไซม์ acetyl-CoA synthase (Acs1) ต่างกับ *Y. lipolytica* ที่สังเคราะห์ acetyl-CoA จาก citrate ที่ส่งออกมาจากไมโทคอนเดรียด้วยเอนไซม์ ATP: citrate lyase (Acl1/Acl2) ดังแสดงในรูปที่ 2 - 5



รูปที่ 2 - 5 เปรียบเทียบกระบวนการสังเคราะห์ acetyl-CoA ของ *S. cerevisiae* (เส้นประ) และ *Y. lipolytica* (เส้นทึบ) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน (Fakas, 2017)

2.4.2 การสังเคราะห์ไขมันของยีสต์โอลิจินัส

กรดไขมันที่สังเคราะห์ได้ภายในร่างแหเอนโดพลาสซึมชนิดขรุขระมีคุณสมบัติเป็นกรด ละลายน้ำยากและเป็นสารออกซีไดซ์ (polyunsaturated fatty acid) ทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงถูกเปลี่ยนเป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) เก็บอยู่ภายในเซลล์ในรูปของลิพิดบอดี (lipid bodies) โดย fatty acyl-CoA รวมตัวกับ glycerol-3-phosphate เกิดเป็น phosphatidate เมื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกจะได้กลีเซอไรด์ซึ่งสามารถรวมตัวกับสารอื่น เช่น โคลีน (choline) ซีรีน (serine) และอินซิทอล (inositol) กลายเป็นฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) แต่การรวมตัวกันนั้น phosphatidate จะถูกเปลี่ยนไปเป็นรูป active form ในรูปอนุพันธ์ของ cytidine diphosphate (CDP) คือ CDP-diacylglycerol แล้วจึงรวมกับสารอื่นๆ (Ratledge, 2004) ดังรูปที่ 2 - 6



รูปที่ 2 - 6 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์ (Kurtzman และคณะ, 2011)

2.5 ลิกโนเซลลูโลสไฮโดรไลสเพื่อการผลิตน้ำมันด้วยยีสต์โอลิจินัส

ลิกโนเซลลูโลสไฮโดรไลส (lignocellulosic hydrolysate) คือ สารละลายที่ได้จากการย่อยสลายพืชมีน้ำตาลกลูโคส (glucose) และไซโลส (xylose) เป็นส่วนประกอบหลัก เนื่องจากผนังเซลล์ของพืชประกอบไปด้วยเส้นใยเซลลูโลสขนาดใหญ่ (cellulose macrofibrils) ประกอบจากเส้นใยเซลลูโลสเส้นเล็ก (microfibrils) จำนวนมากรวมกัน ระหว่างเส้นใยขนาดเล็กมีเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) แทรกอยู่ทำหน้าที่ห่อหุ้มเส้นใยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ป้องกันการย่อยสลายโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์แสดงในรูปที่ 2 - 7 เซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส (glucose) ที่ต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-ไกลโคซิดิก ส่วนเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างซับซ้อนกว่าเซลลูโลสคือเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส (xylose) แมนโนส (mannose) กลูโคส (glucose) อะราบินอส (arabinose) และกาแลคโตส (galactose) ในรูปของพอลิเมอร์ไซแลน แมนแนน กาแลกแตน และอะราบีแนน (Bastawde, 1992) ซึ่งไซแลนมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลไซโลส (ร้อยละ 85-93, (Browning, 1967)) โมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสเชื่อมกับเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน แต่เชื่อมกับลิกนินด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ลิกนินมีโครงสร้างเป็นพอลิฟีนอล (polyphenol) (Cheng และคณะ, 2008) จึงเป็นส่วนที่มีขั้วมากกว่าเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส ตามลำดับ

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลกจึงมีส่วนเหลือจากกระบวนการเก็บเกี่ยวของพืชเศรษฐกิจเช่น ฟางข้าว ใบอ้อย ชังข้าวโพด กากมันสำปะหลัง ทลายปาล์ม อยู่เป็นจำนวนมาก จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการนำส่วนเหลืดังกล่าวมาเปลี่ยนเป็นมูลค่าโดยใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานเช่น เอทานอล ไบโอดีเซล เป็นต้น การนำลิก

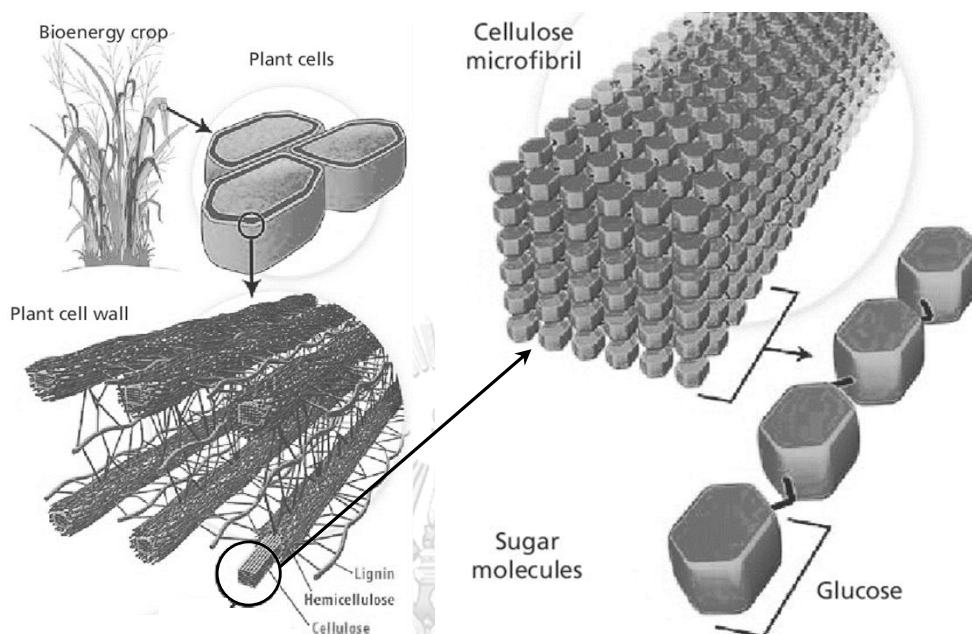
โนเซลลูโลสมาเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลในระดับอุตสาหกรรมประกอบไปด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอนคือการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสทำให้ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส แยกออกจากกันและมีขนาดของโมเลกุลที่เล็กลงเพื่อให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น และตามด้วยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) คือการใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulases) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulases) ย่อยสลายให้ลิกโนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ดังแสดงในรูปที่ 2 - 7 วิธีการปรับสภาพเบื้องต้นแบ่งได้ดังนี้

1. วิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) คือ การลดขนาดอนุภาคโดยการบด (milling and grinding) ทำให้พื้นที่ผิวสำหรับทำปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น
2. วิธีทางกายภาพ-เคมี (physicochemical pretreatment) ได้แก่ การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) การย่อยด้วยน้ำร้อน (hydrothermalolysis) การระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion; AFEX)
3. วิธีทางเคมี ได้แก่ การใช้ต่าง กรดเจือจาง กรดร้อน (acid cooking) สารออกซิไดซ์ การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organosolvent extraction)
4. วิธีทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้ white rot fungi ย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส

การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสในสภาวะที่เป็นกรดร่วมกับความดันและความร้อนก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ทำให้ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพิ่มขึ้นและช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของเฮมิเซลลูโลส แต่ก็ทำให้เกิดสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (growth inhibitor) ตามมาด้วย ตัวอย่างเช่น ในภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูงไซโลสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเฟอร์ฟูรัล (furfural) เช่นเดียวกับกลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปเป็น ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-hydroxymethyl furfural; HMF) กรดฟอมีกที่เกิดขึ้นเป็นอนุพันธ์จากการสลายตัวของเฟอร์ฟูรัลและ HMF กรดเลวูลินิก (levulinic acid) เป็นอนุพันธ์จากการสลายตัวของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (Dunlop, 1948; Ulbricht และคณะ, 1984) สารกลุ่มฟีนอลิกมาจากการสลายตัวบางส่วนของลิกนิน เช่น วานิลลิน (vanillin) ไซริงกัลดีไฮด์ (syringaldehyde) และ กรดไซริงจิก (syringic acid) (Tran และ Chambers, 1985; Jönsson และคณะ, 1998)

การลดความเป็นพิษ (detoxification) ของไฮโดรไลเสตจากลิกโนเซลลูโลสก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงเชื้อทำให้ยีสต์เจริญได้ดีขึ้นและสามารถผลิตเอทานอลหรือน้ำมันได้เพิ่มขึ้น (Palmqvist และ Hahn-Hägerdal, 2000) วิธีลดความเป็นพิษมีหลายวิธี เช่น การใช้เอนไซม์แลคเคส (laccase) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) จากรา *Trametes versicolor* เปลี่ยนสารกลุ่มฟีนอลซึ่งเป็นวงอะโรมาติกไปเป็นกรดอินทรีย์ ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า (Jönsson และคณะ, 1998) และวิธีปรับต่างเกิน (overliming) (Leonard และ Hajny, 1945) เป็นการปรับค่าพีเอชให้เป็น 9 ± 10 ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) จากนั้นปรับพีเอชลดลงเท่ากับ 5.5 ด้วยกรดซัลฟูริก

กระบวนการนี้ทำให้สารกลุ่มของ HMF และเฟอฟูรัลตกตะกอนออกไปได้ ทำให้ผลผลิตของเอทานอลเพิ่มขึ้น (Palmqvist, 1998)



รูปที่ 2 - 7 โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส (Yang และ Wyman, 2009)

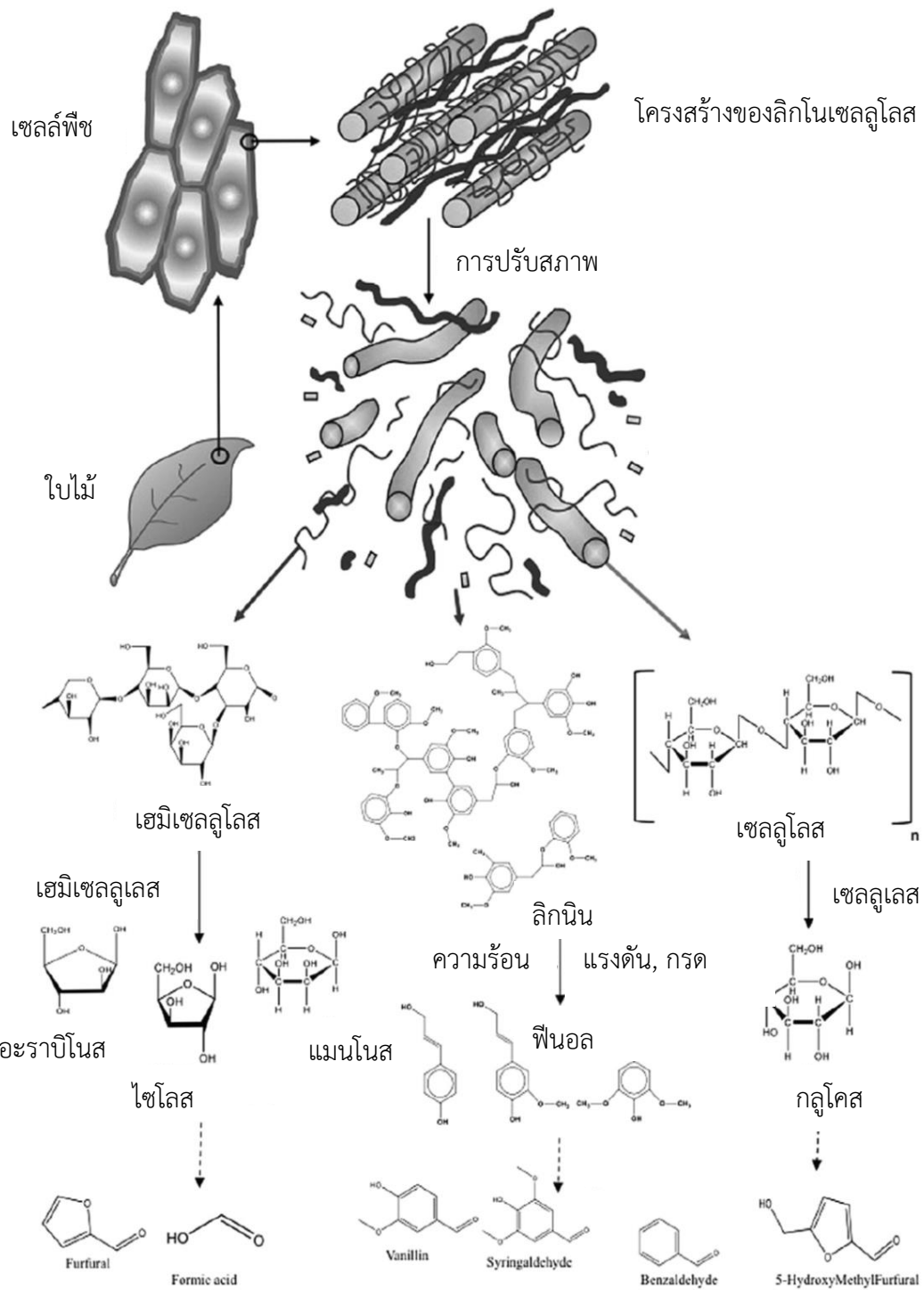
(Sitepu และคณะ, 2014) (2014) ศึกษาความสามารถในการทนสารยับยั้งในกลุ่มเฟอร์ฟูรัลของยีสต์ของยีสต์โอลิจินัสสายพันธุ์ต่างๆ พร้อมทั้งศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆที่มีในลิกโนเซลลูโลสไฮโดรไลเสด พบว่าความเข้มข้นของสารยับยั้งการเจริญมีผลต่อการเจริญของยีสต์โอลิจินัส และยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 - 4 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และความทนทานต่อสารยับยั้งการเจริญของยีสต์น้ำมัน (Sitepu และคณะ, 2014)

สายพันธุ์ยีสต์	แหล่งคาร์บอน										สารยับยั้งการเจริญ				
	Glucose	D-Xylose	L-Arabinose	D-Arabinose	Cellobiose	Mannose	Galactose	Rhamnose	Sucrose	Glycerol	Furfural (0.5 g/l)	Furfural (1.0 g/l)	HMF (0.5 g/l)	HMF (1.0 g/l)	HMF (2 g/l)
<i>Cryptococcus humicola</i> 10-1004															
<i>Cryptococcus humicola</i> 12-717									D						
<i>Cryptococcus laurentii</i> 12-803										D					
<i>Cyberlindhera jadinii</i> 76-80	D				D			D	D	D			D	D	D
<i>Lipomyces starkeyi</i> 78-23					D			D	D				D	D	D
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 40-129								D							
<i>Tricosporon dermatis</i> 63-110															
<i>Yarrowia lipolytica</i> 51-30															

สารเพอร์ฟอรันเป็นสารยับยั้งที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์โอลิจินัสอย่างมากเนื่องจากเพอร์ฟอรันเมื่อเข้าไปในเซลล์จะไปเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับ NADH ทำให้กลายเป็น NAD⁺ ซึ่ง NADH เป็นสารที่สำคัญในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนซึ่งนำไปสู่การสร้างพลังงานในรูป ATP ของเซลล์ ดังนั้นจึง

มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ยีสต์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลที่ความเข้มข้นเท่ากัน เนื่องมาจากความสามารถในการรีดิวซ์ของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล น้อยกว่าเฟอร์ฟูรัลเพราะหมู่ไฮดรอกซีเมทิลที่เพิ่มเข้ามาทำให้โครงสร้างเรโซแนนซ์ในโมเลกุลของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลไม่เสถียรเท่ากับเฟอร์ฟูรัล ทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์ลดลงไป ดังนั้นความสามารถในการทนสารยับยั้งของยีสต์โอลิจินัสเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญในการลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม





รูปที่ 2 - 8 น้ำตาลและสารยับยั้งการเจริญที่ได้จากการปรับสภาพโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส (Sitepu และคณะ, 2014)

ตารางที่ 2 - 4 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และความทนทานต่อสารยับยั้งการเจริญของยีสต์น้ำมัน (Sitepu และคณะ, 2014)

สายพันธุ์ยีสต์	แหล่งคาร์บอน										สารยับยั้งการเจริญ				
	Glucose	D-Xylose	L-Arabinose	D-Arabinose	Cellulose	Mannose	Galactose	Rhamnose	Sucrose	Glycerol	Furfural (0.5 g/l)	Furfural (1.0 g/l)	HMF (0.5 g/l)	HMF (1.0 g/l)	HMF (2 g/l)
<i>Cryptococcus humicola</i> 10-1004										D					
<i>Cryptococcus humicola</i> 12-717									D						
<i>Cryptococcus laurentii</i> 12-803										D					
<i>Cyberlindnera jadinii</i> 76-80	D				D	D			D	D			D	D	D
<i>Lipomyces starkeyi</i> 78-23				D	D		D								
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 40-129				D			D								
<i>Tricosporon dermatitis</i> 63-110															
<i>Yarrowia lipolytica</i> 51-30															

ความเข้มของสีแทนระดับความชุ่มของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อผ่านไป 10 วัน; D, Delayed growth

จากปัจจัยดังกล่าวมาข้างต้นทั้งหมด สิ่งที่ต้องคำนึงถึงเมื่อต้องการผลิตน้ำมันด้วยยีสต์โอลิจินัส โดยใช้ลิกโนเซลลูโลสไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งคาร์บอนมีดังต่อไปนี้ (Jin และคณะ, 2015)

1. ไม่สามารถควบคุมอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนได้เนื่องจากขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ประสิทธิภาพการย่อยลิกโนเซลลูโลส ชนิดของพืชที่ใช้ ปริมาณของสัดส่วนเซลลูโลสต่อเฮมิเซลลูโลส ต่อลิกนิน ปริมาณเอนไซม์ (เป็นแหล่งของไนโตรเจน) ที่เติมลงไปในการย่อย เป็นต้น
2. ปริมาณน้ำตาลที่ได้จำกัด โดยไม่เกิน 100 กรัมต่อลิตร
3. น้ำตาลที่มีในไฮโดรไลเสตมีหลายชนิด ซึ่งมีผลต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันในแง่ของปริมาณและชนิดกรดไขมัน ส่งผลต่อการเลือกสายพันธุ์ของยีสต์โอลิจินัสที่เหมาะสมต่อการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม เพื่อให้ได้ชนิดของน้ำมันตามที่ต้องการ
4. ปริมาณของสารยับยั้งการเจริญของยีสต์จากขั้นตอนการปรับเพื่อการพิจารณาความจำเป็นของการกำจัดสารพิษ หรือใช้ยีสต์โอลิจินัสสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อสารยับยั้งในปริมาณที่มีอยู่ในไฮโดรไลเสตนั้นๆได้

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำมัน

Li และคณะ (2006) รายงานว่า *Rh. toruloides* Y4 ผลิตน้ำมันและเซลล์ได้ 76% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักแห้ง และ 18.2 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบช (batch culture) โดยถ่ายกล้าเชื้ออายุ 28 ชม. ปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารที่มีองค์ประกอบเหมาะสม (optimized medium) ซึ่งที่ประกอบด้วย กลูโคส 7% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.01% ยีสต์สกัด 0.075% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.15% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.04% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่มีซิงค์ซัลเฟตเข้มข้น 1.9×10^6 มิลลิโมล/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 1.50 มิลลิโมล/ลิตร แมงกานีสคลอไรด์ 1.22×10^{-4} มิลลิโมล/ลิตร และคอปเปอร์ซัลเฟต 1.00×10^{-4} มิลลิโมล/ลิตร พีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เหย้าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 120 ชม. ที่อุณหภูมิ 30°C

Li และคณะ (2007) รายงานว่า *Rh. toruloides* Y4 ผลิตน้ำมันและเซลล์ ได้ 67.5% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักแห้ง และ 106.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 15 ลิตร นาน 134 ชม. คิดเป็นอัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.54 กรัม/ลิตร/ชม.

Hu และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตน้ำมัน *Rh. toruloides* Y4 ในอาหารที่มีสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่พบในไฮโดรไลเสตของวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส พบว่า acetate 5-hydroxymethylfurfural และ syringaldehyde ไม่มีผลกระทบต่อการผลิตน้ำมัน แต่ p-hydroxybenzaldehyde และ vanillin ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เริ่มทำให้ปริมาณเซลล์และน้ำมันลดลง และเฟอร์ฟิวรัลเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำให้การเจริญลดลง 45%

Wu และคณะ (2010) ศึกษาการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอน : ฟอสฟอรัส ในอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอน : ไนโตรเจน ต่ำเท่ากับ 6.1 พบว่า *Rh. toruloides* Y4 ผลิตน้ำมันได้ประมาณ 62.2% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักแห้ง เมื่ออาหารมีอัตราส่วนของคาร์บอน : ฟอสฟอรัส เท่ากับ 9,552

Wu และคณะ (2011) ศึกษาการแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอน : ซัลเฟต ในอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอน : ไนโตรเจน ต่ำ (5.7-28.3) พบว่า *Rh. toruloides* Y4 ผลิตน้ำมันได้ประมาณ 57% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักแห้ง เมื่ออาหารมีอัตราส่วนของคาร์บอน : ซัลเฟต เท่ากับ 11,380

Chen และคณะ (2013) รายงานว่า *T. cutaneum* CH002 ผลิตน้ำมันได้เพิ่มขึ้นอีก 26.5% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตซึ่งข้าวโพดในภาวะที่เหมาะสมคือ ปริมาณกล้าเชื้อ 5% ปริมาตร/ปริมาตร อุณหภูมิ 28°C และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 การเติมไนโตรเจนอินทรีย์ไม่ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำมัน (Chen และคณะ, 2013)

Lin และคณะ (2014) รายงานว่า *Rh. toruloides* AS 2.1389 ผลิตน้ำมันในสารละลายไซโลสเข้มข้น 40 กรัม/ลิตรได้ 49.5% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักแห้ง ภายในเวลา 4 วัน เมื่อผลิตน้ำมันด้วยปริมาณเซลล์เริ่มต้นเข้มข้น 2.0×10^8 CFU/มล. แต่เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) จะผลิตน้ำมันได้ 50.3% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักแห้ง ภายใน 8 วัน ดังนั้น การผลิตน้ำมันโดยใช้เซลล์เริ่มต้นปริมาณสูงทำให้มีอัตราการผลิตสูงขึ้นด้วย

Jutakanoke และคณะรายงานวาลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบในไบโอดีเซล *Saccharum officinarum* ประกอบด้วย เซลลูโลส 38.5% เฮมิเซลลูโลส 23% และลิกนิน 15.6% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) หลังการปรับสภาพไบโอดีเซลปริมาณ 6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ได้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสในไฮโดรไลเสต 9.0 กรัม/ลิตร และ 0.62 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำไบโอดีเซลที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลส 160 FPU/กรัม ของน้ำหนักแห้ง นาน 6 ชั่วโมง ได้น้ำตาลกลูโคส 9.8 กรัม/ลิตร จากปัจจัยดังกล่าวไบโอดีเซลจึงมีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตน้ำมันด้วยยีสต์โอลิจินัส (Jutakanoke และคณะ, 2012; Jutakanoke, 2014)

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 ใบอ้อย

ใบอ้อย (*Saccharum officinarum* L.CSB06-2-15) ที่เหลือทิ้งหลังการเก็บเกี่ยวอ้อย (รูปที่ 3 - 1) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคที่ 3 อำเภอบางพระ จังหวัดชลบุรี ตัดใบอ้อยเป็นท่อนสั้นๆ บดด้วยเครื่องบดแบบซ้อนเหวียง จากนั้นอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ร่อนเก็บอนุภาคขนาด 20-40 เมช ซึ่งน้ำหนักวิเคราะห์ค่าความชื้น (moisture content) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใบอ้อย ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน



รูปที่ 3 - 1 ไร่อ้อย (ถ่ายวันที่ 22 ธันวาคม 2559)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.2.1 กล้องจุลทรรศน์เชิงประกอบชนิดใช้แสง (Light Compound Microscope)
CH30, Olympus Co. Ltd., Japan
- 3.2.2 กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence Microscope) Olympus BX51,
USA

- 3.2.3 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate magnetic stirrer) 502P-2, PMC Industries Inc., USA
- 3.2.4 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) Prostar, USA
- 3.2.5 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) Agilent 6890N, Delaware, USA
- 3.2.6 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลอง (Dry block bath) MG-1, Itohka, Japan
- 3.2.7 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2-digital balance) PG6002-S, Mettler Toledo Co.Ltd., Switzerland
- 3.2.8 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4-digital balance) AG285, Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
- 3.2.9 เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentary System) Bio-Rad, USA
- 3.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) Allegra™ 25R, Beckman Coulter Inc., USA
- 3.2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) Kubota 1920, Kubota Cooperation, Japan
- 3.2.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin down) Force mini, Korea
- 3.2.13 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) G560, Scientific Industries Inc., USA
- 3.2.14 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycler) Bio-Rad, USA
- 3.2.15 เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า (Gel electrophoresis equipment) Mupid-2plus, Japan
- 3.2.16 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Genesys™ 10S-UV-VIS, Thermo Scientific Inc., USA
- 3.2.17 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงชนิดนาโน (Nano drop 2000 UV-VIS spectrophotometer) Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- 3.2.18 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) S20 SevenEasy™, Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
- 3.2.19 เครื่องวิเคราะห์ชีวเคมี (Biochemistry Analyzer) YSI 2700 SELECT, USA

- 3.2.20 เครื่องให้ความร้อนสารละลาย (Hot plate) RK 18715 E.G.O., Poland
- 3.2.21 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer) N-100, Eyela, Japan
- 3.2.22 ตะแกรงร่อนเบอร์ 20 ขนาดตาข่าย 850 ไมครอน Advantech, USA
- 3.2.23 ตะแกรงร่อนเบอร์ 40 ขนาดตาข่าย 425 ไมครอน Advantech, USA
- 3.2.24 ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ -20 องศาเซลเซียส (Freezer) Forma Scientific, USA
- 3.2.25 ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ -80 องศาเซลเซียส (Freezer) Forma Scientific, USA
- 3.2.26 ตู้ดูดควัน (Fume hood) Dalton Co. Ltd., Japan
- 3.2.27 ตู้บ่ม (Incubator) SANYO, Japan
- 3.2.28 ตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker) Innova 4330, New Brunswick Scientific Co. Ltd., UK
- 3.2.29 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) H2 LAB service Ltd., Thailand
- 3.2.30 ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven) UE600, Memmert Co. Ltd., Germany
- 3.2.31 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 5 มล., Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
- 3.2.32 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 1000, 200, 20, 10 และ 2 ไมโครลิตร, Gilson Company Inc., USA
- 3.2.33 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ES-215 TOMY Digital Biology Co. Ltd., Japan
- 3.2.34 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) SS-325, TOMY Digital Biology Co. Ltd., Japan
- 3.2.35 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) SS40-D, Grant Instrument Co. Ltd., UK

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid: H_2SO_4) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.2 กรดอะซิติก (Acetic acid: $C_2H_4O_2$) Sigma Inc., Germany
- 3.3.3 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid: HCl) Sigma Inc., Germany
- 3.3.4 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium Chloride: $CaCl_2$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.5 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium Hydroxide: $Ca(OH)_2$) Merck Co. Ltd., Germany

- 3.3.6 คลอโรฟอร์ม (Chloroform 99.8%) V.S. Chem House, Thailand
- 3.3.7 คลอแรมฟิโนคอล (Chloramphenicol) AppliChem, Germany
- 3.3.8 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride: NaCl) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.9 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Dodecyl sodium sulfate: SDS: $C_{12}H_{25}OSO_2ONa$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.10 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide: NaOH) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.11 โซเดียมโพรพิโอเนต (Sodium Propionate) Sigma Inc., Germany
- 3.3.12 ไซโลส (Xylose) Ameresco, LLC. USA
- 3.3.13 ดี-กลูโคส (D-Glucose: $C_6H_{12}O_6$) Sigma Inc., Germany
- 3.3.14 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) Fisher Scientific, UK
- 3.3.15 ทริส (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) Affymetrix Inc., USA
- 3.3.16 ทริส-อะซีเตท-อีดีทีเอ (Tris-Acetate-EDTA: TAE buffer) Vivantis Inc., USA
- 3.3.17 ไนล์เรด (Nile red: $C_{20}H_{18}N_2O_2$) Chem Impex Int'l Inc., USA
- 3.3.18 เบคโตเพปโตน (Bactopeptone) Becton Co. Ltd., Germany
- 3.3.19 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate: KH_2PO_4) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.20 โพแทสเซียมอะซีเตท (Potassium acetate: CH_3COOK) Sigma Inc., Germany
- 3.3.21 เฟอร์ฟูรัล (Furfural) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.22 มอลต์สกัด (Malt extract) Becton Co. Ltd., Germany
- 3.3.23 เมทานอล (Methanol 99.9% (ปริมาตร/ปริมาตร)) V.S. Chem House, Thailand
- 3.3.24 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (Magnesium sulfate heptahydrate: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.25 ฐันผง (Agar) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.26 ยีสต์ไนโตรเจนเบสปราศจากกรดอะมิโน (Yeast nitrogen base w/o amino acid) Becton Co. Ltd., Germany
- 3.3.27 ยีสต์สกัด (Yeast extract) Becton Co. Ltd., Germany
- 3.3.28 อะกาโรส (Agarose) Sigma Inc., Germany
- 3.3.29 อะซิโตน (Acetone) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.30 เอทานอล (Ethanol 99% (ปริมาตร/ปริมาตร)) Sigma Inc., Germany

- 3.3.31 เอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก (EDTA) Sigma Inc., Germany
- 3.3.32 แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) Merck Co. Ltd., Germany
- 3.3.33 ไอโซโพรพานอล (Isopropanol 99.5% (ปริมาตร/ปริมาตร)) Sigma Inc., Germany
- 3.3.34 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamyl alcohol 98% (ปริมาตร/ปริมาตร)) Sigma Inc., Germany
- 3.3.35 ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลดีไฮด์ (5-Hydroxymethylfurfural) Sigma Inc., Germany

3.4 จุลินทรีย์

- 3.1.1 *Lipomyces starkeyi* JCM 5995 จาก Japan Collection of Microorganism ประเทศญี่ปุ่น

3.5 วิธีการ

3.5.1 การคัดแยกยีสต์โอลิจินัส

3.5.1.1 การคัดแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติพื้นที่จังหวัดระนอง

เก็บตัวอย่างดิน น้ำ และเปลือกไม้ผุพังจากแหล่งธรรมชาติ 3 แห่งได้แก่ สถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 อำเภอเมืองระนอง สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 อำเภอละอุ่น และอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว อำเภอเมืองระนอง นำตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดยีสต์ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดมอลต์ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพปโตน 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) คลอแรมเฟนิคอล 0.0001% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (Kitcha และ Cheirsilp, 2011) และโซเดียมโพรฟิไอเนต 0.025% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอชเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยวิธีการขีดเชื้อ (streak plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM แล้วเก็บยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้บนอาหารแข็ง YM ผิวหน้าเอียง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.1.2 การตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์เบื้องต้น

ตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์ของยีสต์ที่แยกได้ เลี้ยงยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในหลอดทดลองขนาด 20×200 มิลลิเมตร ภายในบรรจุด้วยอาหารเหลวที่มี

ปริมาณคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ คิดเป็นอัตราส่วนคาร์บอน (C) : ไนโตรเจน (N) เท่ากับ 500 (low-nitrogen medium; High C/N medium) ประกอบด้วย กลูโคส 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ยีสต์สกัด 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โซเดียมคลอไรด์ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แคลเซียมคลอไรด์ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 5.5 (Tanimura และคณะ, 2014) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาย้อมด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ไนล์เรด (Nile red) โดยใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย (solvent) เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 25% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 99 ไมโครลิตร (Kimura และคณะ, 2004; Sitepu และคณะ, 2012) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ตรวจสอบด้วยไมโครสโคปที่เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ผ่านฟิลเตอร์ U-WNB2 ค่าความยาวคลื่น excitation และ emission เท่ากับ 470-490 และ 520 นาโนเมตร ตามลำดับ (Olympus BX51, America) กำลังขยาย 1,000 เท่า คัดกรองเชื้อที่พบการสะสมไขมันภายในเซลล์มากกว่า 50% ของพื้นที่เซลล์ไปศึกษาต่อไป

3.5.1.3 การคัดกรองยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลส

นำยีสต์ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5.1.2 มาทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ประกอบด้วย ยีสต์ไนโตรเจนที่ไม่มีกรดอะมิโน 0.67% (น้ำหนัก/ปริมาตร) น้ำตาลไซโลส 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) วุ้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

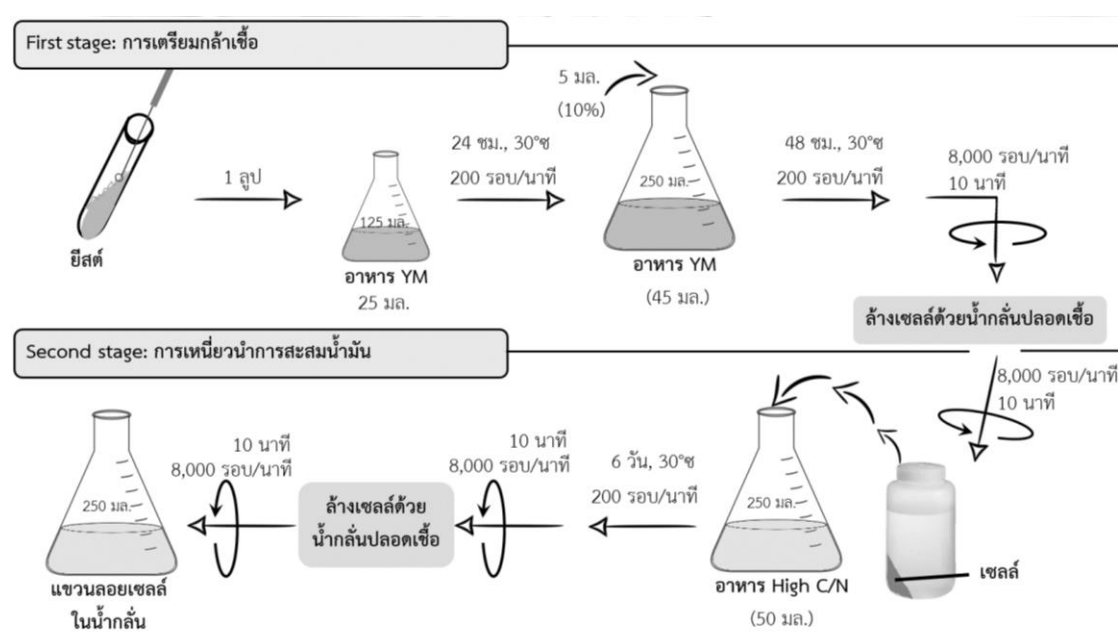
3.5.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5.1.3 โดยการเพาะเลี้ยงแบบ two stage fermentation (Ryu และคณะ, 2013) ดังแสดงในรูปที่ 3 - 2

3.5.1.3.1 First stage ถ่ายโอนยีสต์ 1 ลูบ ลงอาหารเหลว YM 25 มิลลิลิตร ในฟลากส์ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหาร YM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3.5.1.3.2 Second stage นำเซลล์ทั้งหมดจาก first stage ไปเลี้ยงต่อในอาหาร High C/N ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 6 วัน ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ ทำให้เซลล์แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ชั่งน้ำหนัก

เซลล์แห้ง สกัดน้ำมันจากเซลล์แห้งด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ตามวิธีของ Kitcha และคณะ (2011) แขนวลอยเซลล์แห้งเยือกแข็ง 0.5 กรัม ในสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (อัตราส่วน 2:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (37 กิโลเฮิร์ตซ์) เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.73 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อกำจัดส่วน non-lipid (Axelsson และ Gentili, 2014) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดเก็บส่วนใสชั้นล่าง ระเหยสารละลายที่ได้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักน้ำมันที่สกัดมาได้ คัดเลือกยีสต์ยีสต์โอลิจินัสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 3 - 2 แผนผังการผลิตน้ำมันด้วยวิธี two stage fermentation

3.5.2 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

3.5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (Endoh และคณะ, 2008)

สกัดดีเอ็นเอของยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดจากข้อ 5.3.1.1 โดยผสมเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลายไลซิส (lysis solution) (ทริส ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก 0.03 โมลาร์ โซเดียมโดดีซิล ซัลเฟต 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตทเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใส (supernatant) ตกตะกอนโปรตีนโดยผสมกับสารผสมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนน้ำใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใส ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยผสมกับไอโซโพรพานอลเย็นปริมาตร 1 เท่าของส่วนน้ำใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 นาที เก็บส่วนตะกอน ล้างตะกอนด้วยการเติมเอทานอลเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างตะกอนอีกครั้งด้วยเอทานอล 95% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิม ทำแห้งตะกอนที่ได้ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2.2 การจัดกลุ่มเชื้อด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR fingerprinting) (Endoh และคณะ, 2011)

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีสต์ที่สกัดได้จากข้อ 3.5.2.1 โดยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ เมอร์จีจีจีไฟฟ์ (microsatellite primer (GTG)₅, 5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3') โดยองค์ประกอบปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10X Vbuffer A	2	ไมโครลิตร
50 mM Mg ₂ Cl ₂	0.8	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	0.2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ (GTG) ₅ เข้มข้น 10 พิโคโมล/มล.	1	ไมโครลิตร
Taq polymerase เข้มข้น 5 U/ไมโครลิตร	0.12	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	13.88	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอของยีสต์ที่สกัดได้	2	ไมโครลิตร

ภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นดังนี้

Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
Denaturation*	93 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที
Annealing*	50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
Polymerization*	72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
Final polymerization	72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที

* จำนวน 40 รอบ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) แยกกลุ่มของเชื้อตามรูปแบบการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆออกจากกัน (ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ) ที่ปรากฏ

3.5.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 บนยีน 26S rDNA (Endoh และคณะ, 2008)

เลือกตัวแทนเชื้อจากแต่ละกลุ่มของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากข้อ 3.5.2.2 นำดีเอ็นเอของเชื้อที่เป็นตัวแทนกลุ่มมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ large subunit (LSU) ของยีน rDNA โดยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด NL1 (5'- GCATATCAA TAAGCGGAGGAAAAG-3') และไพรเมอร์รีเวิร์ส NL4 (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman และ Robnett, 2003) องค์ประกอบปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10X Vibuffer A	5	ไมโครลิตร
50 mM Mg ₂ Cl ₂	3	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	0.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด เข้มข้น 10 พิโคโมล/มิลลิลิตร	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์รีเวิร์ส เข้มข้น 10 พิโคโมล/มิลลิลิตร	1	ไมโครลิตร
Taq polymerase เข้มข้น 5 U/ไมโครลิตร	0.5	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	34	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอของยีสต์ตัวแทนกลุ่ม	5	ไมโครลิตร

ภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
Denaturation*	94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
Annealing*	52 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
Polymerization*	72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
Final polymerization	72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

* จำนวน 36 รอบ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดคิท (Geneaid™, Taiwan) นำไปวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Bioneer Corporation ประเทศเกาหลี วิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.2.5 (Hall, 1999) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn บนเว็บไซต์ NCBI

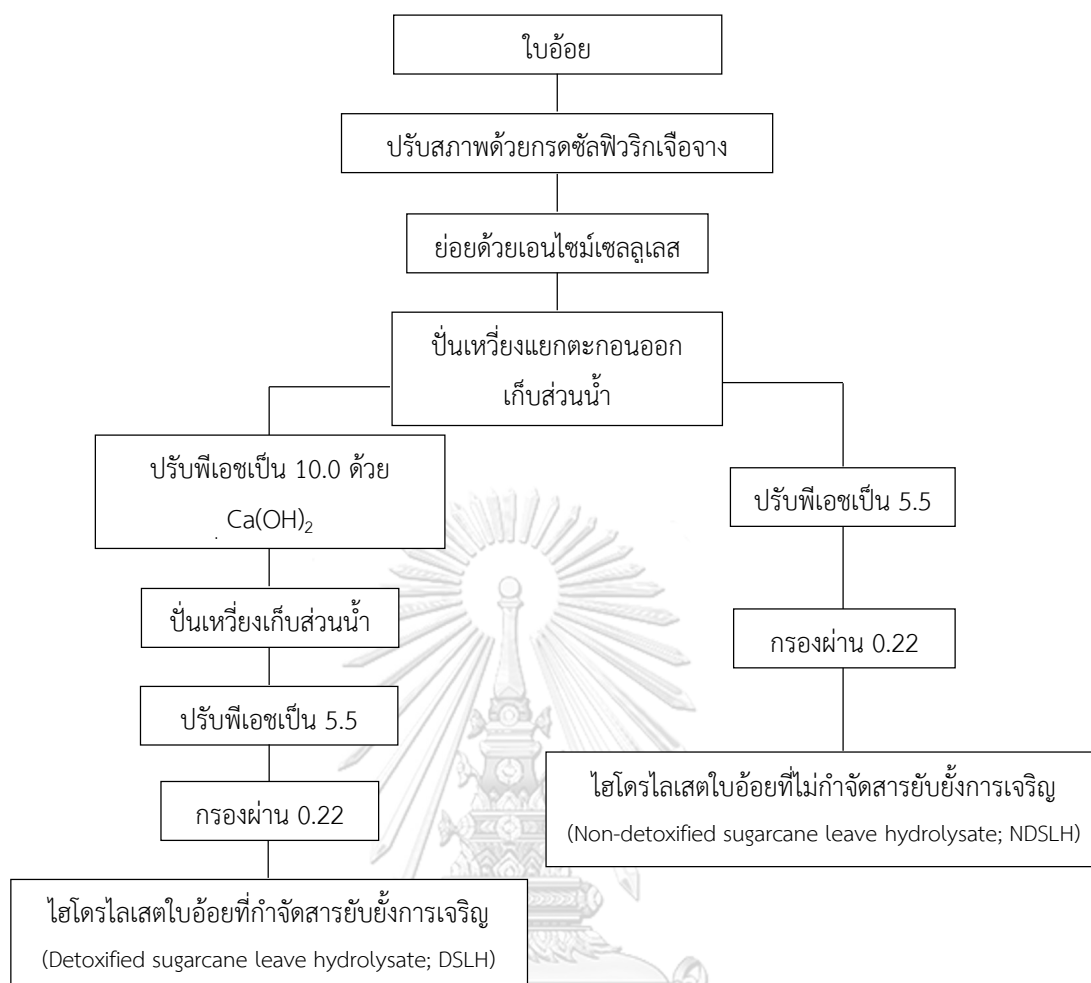
3.5.2.4 การสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง LSU D1/D2 มาเรียงเทียบกัน (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม muscle (Edgar, 2004) วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยวิธี Neighbor-joining และ maximum-parsimony ด้วยโปรแกรม MEGA 6 เวอร์ชัน 7.0.26 (Tamura และคณะ, 2013) วิเคราะห์ nucleotide-sequence divergence ด้วยแบบจำลอง Kimura-2-parameter และวิเคราะห์ค่า Bootstrap ซ้ำ จำนวน 1,000 ครั้ง

3.5.3 การเตรียมไฮโดรไลเสตใบอ้อย (รูปที่ 3 - 3)

ไฮโดรไลเสตใบอ้อยสำหรับกล้าเชื้อ (first stage) เตรียมตามรายงานของ Jutakanoke และคณะ (2012) ปรับสภาพ (pretreatment) ใบอ้อยโดยแขวนลอยใบอ้อยที่ได้จากข้อ 3.1 ปริมาณ 6 กรัม ในสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คิดเป็น 6% substrate loading ให้ความร้อนไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 30 นาที ปรับพีเอชเป็น 5.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15 โมลาร์ นำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Accellulase™ 1500., USA) (2,200-2,800 CMC U/g) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรต่อใบอ้อย 1 กรัม บ่มเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง กรองแยกกากออก ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำ และเพิ่มปริมาณใบอ้อยเป็น 12% substrate loading ในการเตรียมไฮโดรไลเสตใบอ้อยสำหรับ second stage ไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่เตรียมได้จะแทนด้วยสัญลักษณ์ NDSLH

การกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ทำโดยวิธีปรับต่างเกิน (overliming) (Yu และคณะ, 2011) จนกระทั่งพีเอชเป็น 10 บ่มเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปรับพีเอชเท่ากับ 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมครเมตร เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองต่อไป วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส โดยเครื่อง YSI 7100 MBS วิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ Furfural และ Hydroxymethylfurfural ด้วยเทคนิค HPLC (Bhatia และคณะ, 2017) ใช้คอลัมน์ Varian C₁₈ เฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมกรดอะซิติกกับเมทานอล อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) ไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่เตรียมได้จะแทนด้วยสัญลักษณ์ DSLH



รูปที่ 3 - 3 แผนผังการเตรียมไฮโดรไลเสตใบอ้อย

3.5.4 การผลิตน้ำมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตใบอ้อย

3.5.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (first stage)

ปลุกยีสต์โอลิจินัสที่สามารถใช้ไซโลสที่คัดกรองได้จากข้อ 3.5.1.4 ลงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่เติม ยีสต์สกัด 0.3% และ 0.3% เบคโตเพปโตน (น้ำหนัก/ปริมาตร) (Jutakanoke, 2014) 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายโอนเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารสูตรเดิม ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 บมที่ภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วนำเซลล์ทั้งหมดไปใช้ในขั้นต่อไป

3.5.4.2 การผลิตไขมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตใบอ้อย (second stage)

นำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.4.1 มาเลี้ยงต่อในไฮโดรไลเสตใบอ้อย ซึ่งเตรียมจากการปรับสภาพและย่อยใบอ้อยที่ปริมาณ (substrate loading) 12% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

50 มิลลิลิตร ในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 6 วัน ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ ทำให้เซลล์แห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งนำหนักเซลล์แห้งแล้วสกัดน้ำมันจากเซลล์แห้งตามวิธีเดียวกับข้อ 3.5.1.4 เปรียบเทียบปริมาณน้ำมันยีสต์ที่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์โอลิจินัสที่คัดกรองได้ในไฮโดรไลเสตใบอ้อยซึ่งผ่านและไม่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์โดยวิธีปรับต่างเกิน

3.5.4.3 หาภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์จากไฮโดรไลเสตใบอ้อย

โดยแปรผันการเติมและไม่เติม แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ลงในไฮโดรไลเสตใบอ้อย พีเอช และระยะเวลาการบ่ม

3.5.5 วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันที่เตรียมได้

วิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันยีสต์โอลิจินัสซึ่งสามารถใช้น้ำตาลไซโลสที่คัดกรองได้ที่ผลิตจากไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ภาวะเหมาะสม โดยวิธี gas chromatography (Anamnart และคณะ, 1998; Limsuwatthanathamrong และคณะ, 2012)



บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกและจัดจำแนกชนิดยีสต์โดยหลักอนุกรมวิธานโมเลกุลและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

4.1.1 ผลการคัดแยกและจัดจำแนกชนิดยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติพื้นที่จังหวัดระนอง

ตัวอย่าง (ตารางที่ 4 - 1, ตารางที่ 4 - 2, ตารางที่ 4 - 3) รวม 63 ตัวอย่าง จากแหล่งธรรมชาติ 3 แห่งได้แก่ สถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 และอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จ.ระนอง แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 จำนวน 29 ไอโซเลต (ตารางที่ 4 - 1) สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จำนวน 58 ไอโซเลต (ตารางที่ 4 - 2) และอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จำนวน 19 ไอโซเลต (ตารางที่ 4 - 3) จัดกลุ่มยีสต์ทั้งหมดตามรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ 29 กลุ่ม (รูปที่ 4 - 1) แล้วเลือกยีสต์ที่เป็นตัวแทนกลุ่มไปจำแนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง D1/D2 ของยีน LSU rDNA ในการทดลองต่อไป

ผลการจัดจำแนกชนิดยีสต์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของยีน LSU rDNA พบว่ายีสต์ที่แยกได้จากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 (ตารางที่ 4 - 4) พบว่าจัดอยู่ใน 4 จีนัส 8 สปีชีส์ คือ *Candida glabrata*, *C. silvae*, *C. orthopsilosis*, *C. sanitii*, *C. tropicalis*, *Kluyveromyces aestuarii*, *Kodamaea ohmeri* และ *Meyerozyma caribbica* และ โดยยีสต์ที่พบมากที่สุดคือ *K. aestuarii* คิดเป็น 55.17% ของจำนวนยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด รองลงมาคือ *M. caribbica* และ *C. glabrata* คิดเป็น 13.79% และ 10.34% ตามลำดับ

ผลการจัดจำแนกชนิดยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 (ตารางที่ 4 - 5) พบว่าจัดอยู่ใน 10 จีนัส 16 สปีชีส์ คือ *C. edaphicus*, *C. carpophila*, *C. glabrata*, *C. pseudolambica*, *C. orthopsilosis*, *C. thaimueangensis*, *C. tropicalis*, *Hanseniaspora thailandica*, *K. aestuarii*, *Lachancea thermotolerans*, *Nakazawaea siamensis*, *Pichia kudriavzevii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Schwanniomyces vanriijiae*, *Trichosporon mycotoxinivorans* และ *Wickerhamomyces sydowiorum* โดยยีสต์ที่พบมากที่สุดคือ *K. aestuarii* เช่นเดียวกันกับตัวอย่างจากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 คิดเป็น 17.24% ของยีสต์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ รองลงมาคือ *C. tropicalis* (15.52%) และ *Sch. vanriijiae* (13.79%) นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลต MG11-13.3 ที่แยกได้จากคราบแมลง (insect

frass) อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ในจีนัส *Candida* ทั้งนี้เพราะเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LSU rDNA บนตำแหน่ง D1/D2 ของไอโซเลต MG11-13.3 กับของยีสต์ในฐานข้อมูล GenBank บนเว็บไซต์ NCBI โดยโปรแกรม BLASTn พบว่ามีความเหมือนกับของยีสต์ *Candida* sp. ST-224 และ *C. silvanorum* เท่ากับ 100% และ 85% ตามลำดับ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากของ *C. silvanorum* 13 นิวคลีโอไทด์ โดย *Candida* sp. ST-224 แยกได้จากคราบแมลงเช่นกัน (Jindamorakot, 2006) จากแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการชนิด Neighbor-joining พบว่า *Candida* MG11-13.3 แยกออกจาก *C. silvanorum* อย่างชัดเจนด้วยค่า Bootstrap เท่ากับ 100% (รูปที่ 4 - 2) ซึ่งหลักการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่ง D1/D2 คือ เมื่อนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ทั้งสองสปีชีส์ต่างกันไม่เกิน 3 การแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ให้จัดเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกัน แต่ถ้าหากลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันมากกว่า 5 การแทนที่นิวคลีโอไทด์ขึ้นไป แสดงว่ายีสต์สองสปีชีส์นั้นจัดเป็นคนละสปีชีส์กัน (Fell และคณะ, 2000)

K. aestuarii ที่พบมากที่สุดในตัวอย่างจากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 และสถานีวิจัยพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 แยกได้ครั้งแรกจากดินตะกอนบริเวณปากอ่าว Biscayne รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา (Fell, 1961) ผลการศึกษาการกระจายตัวของยีสต์ *K. aestuarii* ในพื้นที่ป่าชายเลนเมืองรีโอเดจาเนโร ประเทศบราซิล พบว่าจากตัวอย่างดินตะกอนจำนวน 8 ตัวอย่าง มีเพียง 1 ตัวอย่าง เท่านั้นที่ไม่พบยีสต์ชนิดนี้ ซึ่งเป็นดินตะกอนจากป่าชายเลนที่เชื่อมต่อกับชายหาดซึ่งมีขยะพลาสติกที่ถูกคลื่นพัดมาอยู่บนชายหาดเป็นจำนวนมาก (Araujo และ Hagler, 2011) การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนที่มณฑลไหหลำ มณฑลกุ้ยโจว และมณฑลฝูเจี้ยน ประเทศจีน โดยคัดแยกยีสต์จากดินตะกอน และส่วนต่างๆของต้นไม้ พบว่า *K. aestuarii* เป็นประชากรหลักโดยมีจำนวนมากเป็นอันดับที่สามรองจาก *C. tropicalis* และ *Kod. ohmeri* (Chi และคณะ, 2012) ในทางตรงกันข้าม การศึกษาประชากรยีสต์ในป่าชายเลนใกล้ชุมชนที่ถูกรบกวนจากกิจกรรมของมนุษย์มีการปนเปื้อนของขยะและแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มจำนวนมาก ณ เมืองรีโอเดจาเนโร ประเทศบราซิล ไม่พบยีสต์ *K. aestuarii* แต่พบยีสต์กลุ่มที่มีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์ (human-associated yeasts) เช่น *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. kudriavzevii* เป็นต้น (Hagler และคณะ, 1982) ดังนั้นยีสต์ *K. aestuarii* จึงถูกจัดเป็นยีสต์บ่งชี้ (indicator) ของสภาพระบบนิเวศน์ป่าชายเลนที่มีความสมบูรณ์ จากผลศึกษาประชากรยีสต์ในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในป่าชายเลน ณ อ่าว Sepetiba เมืองรีโอเดจาเนโร ประเทศบราซิล ซึ่งพบยีสต์ *K. aestuarii* เฉพาะในลำไส้ของสัตว์กินเศษซาก (detritus) แต่ไม่พบยีสต์นี้ในสัตว์น้ำก่ล่า จึงคาดว่า *K. aestuarii* เป็นยีสต์เฉพาะถิ่นที่พบได้ในเศษซากต่างๆ ที่บริเวณป่าชายเลน (de Araujo และคณะ, 1995)



รูปที่ 4 - 1 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติพื้นที่จังหวัดระนอง

ตารางที่ 4 - 1 ตัวอย่างจากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)
1	ดินบริเวณต้นโกงกางใบใหญ่	1
2	ดินบริเวณต้นแสมดำ	3
3	ดินบริเวณต้นโกงกางใบเล็ก	1
4	ดินบริเวณรากต้นแสมดำ	2
5	ดินจากใบพาย	1
6	มอส	-
7	ดินแม่หอบ	1
8	ดินบริเวณต้นตะบูนขาว	1
9	ขี้แมลงในโพรงแสมดำแท้ 750 ปี	-
10	รังปลวกบริเวณต้นแสมดำ	2
11	ราและขี้แมลงจากต้นแสมดำ	2
12	ดินบริเวณทางเดินลง	2
13	น้ำบริเวณต้นโกงกางใบใหญ่	1
14	น้ำบริเวณต้นแสมดำ	1
15	น้ำบริเวณต้นโกงกางใบเล็ก	3
16	น้ำบริเวณรากต้นแสมดำ	-
17	น้ำบริเวณใบพาย	3
18	น้ำบริเวณรังแม่หอบ	2
19	น้ำบริเวณต้นตะบูนขาว	3
20	น้ำบริเวณทางเดินลง	-
รวม		29

ตารางที่ 4 - 2 ตัวอย่างจากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)
1	ดินรังแม่หอบ	3
2	ดินบริเวณต้นเหงือกปลาหมอดอกม่วง	3
3	ดินบริเวณต้นหวายลิง	2
4	ดินบริเวณตะบูนดำ	2
5	ดินบริเวณต้นถั่วดำ	1
6	ดินบริเวณต้นถั่วขาว	-
7	ดินต้นตาทุ่มทะเล	-
8	ใบชายผ้าสีดาผูกฟุ้ง	2
9	ดินบริเวณต้นเตยทะเล	3
10	ดินบริเวณต้นมังคะ	1
11	ดินบริเวณต้นตะบูนดำ	4
12	รากต้นเฟิน	3
13	คราบจึกจั่น	3
14	ดินรังแม่หอบ	2
15	มอสและไลเคน	3
16	ไลเคน	2
17	ไลเคน	3
18	ใบไม้ผูกฟุ้ง	2
19	น้ำในรังแม่หอบ	2
20	น้ำบริเวณต้นเหงือกปลาหมอดอกม่วง	1
21	น้ำบริเวณบริเวณต้นหวายลิง	2
22	น้ำบริเวณบริเวณตะบูนดำ	4
23	น้ำบริเวณบริเวณต้นเตยทะเล	2
24	น้ำบริเวณต้นมังคะ	1
25	น้ำบริเวณบริเวณต้นตะบูนดำ	3
26	น้ำบริเวณต้นโกงกางใบเล็ก	4
รวม		58

ตารางที่ 4 - 3 ตัวอย่างจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)
1	ดินบริเวณน้ำไหล	1
2	ดินบริเวณน้ำนิ่ง	1
3	รากต้นไม้	-
4	ดินบริเวณโคนต้นไม้	4
5	เศษไม้ผุพังและขี้แมลง	1
6	เปลือกไม้	1
7	มอส	-
8	ดินบริเวณโคนต้นไม้ริมทางเดิน	1
9	รากต้นไม้ที่ผุพังแล้ว	-
10	ดินใต้ต้นไม้ริมทางเดิน	1
11	เปลือกไม้และเห็ด	-
12	มอสและไลเคน	1
13	เห็ด	2
14	เปลือกไม้ต้นโกสน	1
15	ไลเคน	-
16	ดินบริเวณรอยเดินปลวก	-
17	ดินรังปลวก	1
18	ไม้ผุ	-
19	ไลเคน	1
20	รังปลวก	1
21	เปลือกไม้และไลเคน	-
22	น้ำบริเวณน้ำไหล	-
23	น้ำดินบริเวณน้ำนิ่ง	-
24	เปลือกไม้	1
25	มอสและไลเคน	1
รวม		19

ตารางที่ 4 - 4 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลน
ที่ 1

ยีสต์ที่คัดแยกได้	จำนวน (ไอโซเลต)	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Genbank accession no.), ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)
<i>Candida glabrata</i>	3	<i>Candida glabrata</i> (U44808) (99%)
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	<i>Candida orthopsilosis</i> (FJ746056) (99%)
<i>Candida silvae</i>	1	<i>Candida silvae</i> (U71065) (99%)
<i>Candida sanitii</i>	1	<i>Candida sanitii</i> (AB332401) (99%)
<i>Candida tropicalis</i>	1	<i>Candida tropicalis</i> (U45749) (100%)
<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	16	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> (U69579) (99%)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1	<i>Kodamaea ohmeri</i> (U45702) (100%)
<i>Meyerozyma caribbica</i>	5	<i>Meyerozyma caribbica</i> (AY187283) (99%)

ตารางที่ 4 - 5 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11

ยีสต์ที่คัดแยกได้	จำนวน (ไอโซเลต)	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Genbank accession no.), ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)
<i>Candida edaphicus</i>	2	<i>Candida edaphicus</i> (AB247371) (99%)
<i>Candida carpophila</i>	1	<i>Candida carpophila</i> (U62311) (100%)
<i>Candida glabrata</i>	3	<i>Candida glabrata</i> (U44808) (99%)
<i>Candida pseudolambica</i>	2	<i>Candida pseudolambica</i> (U71063) (99%)
<i>Candida orthopsilosis</i>	5	<i>Candida orthopsilosis</i> (FJ746056) (99%)
<i>Candida thaimueangensis</i>	1	<i>Candida thaimueangensis</i> (AB264009) (100%)
<i>Candida tropicalis</i>	9	<i>Candida tropicalis</i> (U45749) (100%)
<i>Candida sp.</i>	1	<i>Candida silvanorum</i> (U71068) (85%)
<i>Hanseniaspora thailandica</i>	2	<i>Hanseniaspora thailandica</i> (DQ404527) (100%)
<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	10	<i>Kluyveromyces aestuarii</i> (U69579) (99%)

ตารางที่ 4 - 5 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 (ต่อ)

ยีสต์ที่คัดแยกได้	จำนวน (ไอโซเลต)	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Genbank accession no.), ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)
<i>Lachancea thermotolerans</i>	1	<i>Lachancea thermotolerans</i> (AY046130) (100%)
<i>Nakazawaea siamensis</i>	1	<i>Nakazawaea siamensis</i> (AB772177) (100%)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	4	<i>Pichia kudriavzevii</i> (EF550222) (100%)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AF070432) (100%)
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	8	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i> (U45842) (100%)
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	1	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388) (99%)
<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>	1	<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i> (EF550343) (98%)

ตารางที่ 4 - 6 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว

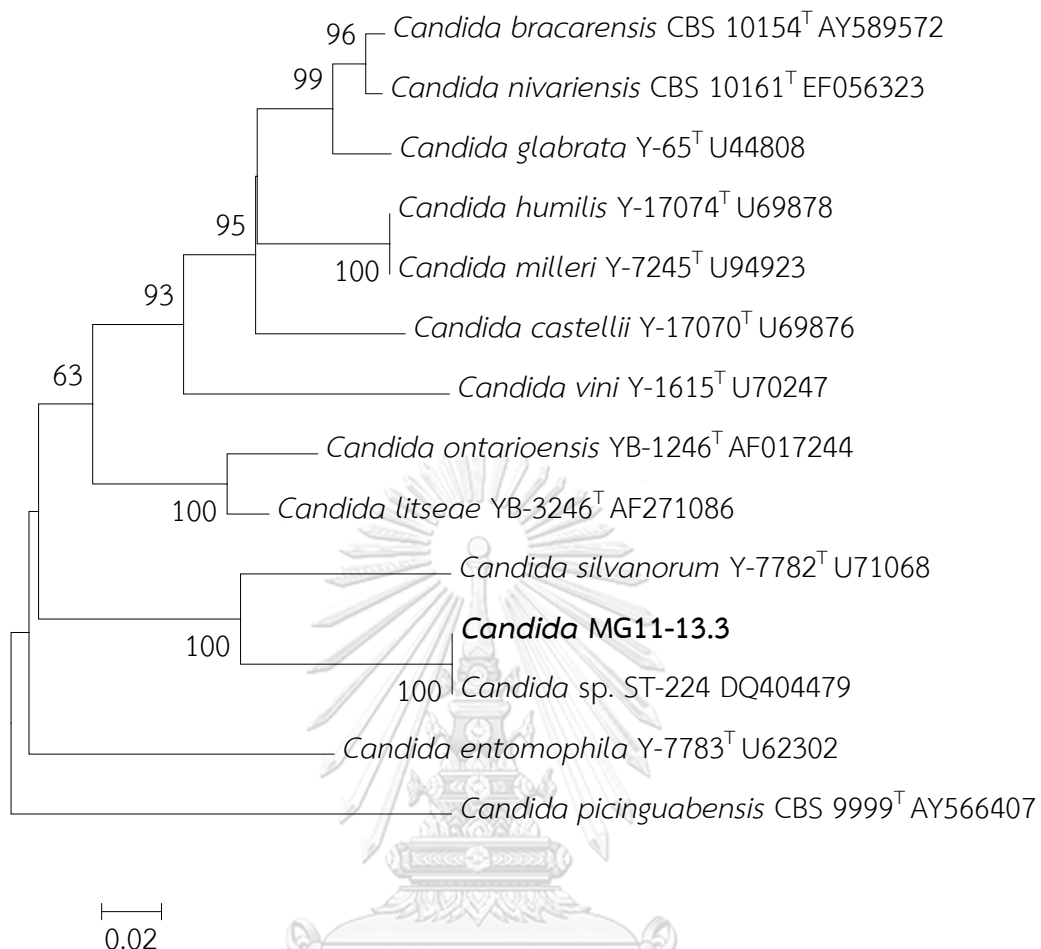
ยีสต์ที่คัดแยกได้	จำนวน (ไอโซเลต)	สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (Genbank accession no.), ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)
<i>Candida akabanensis</i>	3	<i>Candida akabanensis</i> (EU100744) (100%)
<i>Candida tropicalis</i>	1	<i>Candida tropicalis</i> (U45749) (100%)
<i>Cryptococcus humicola</i>	1	<i>Cryptococcus humicola</i> (AF189836) (99%)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AF075469) (99%)
<i>Cyberlindnera subsufficiens</i>	1	<i>Cyberlindnera subsufficiens</i> (EF550318) (99%)
<i>Kurtzmaniella</i> sp.	3	<i>Candida zeylanoide</i> (U45832) (98%)
<i>Saccharomyces fermentans</i>	1	<i>Saccharomyces fermentans</i> (U73600) (99%)
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	2	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i> (U45842) (100%)
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	1	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388) (99%)
<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>	2	<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i> (EF550343) (98%)
<i>Wickerhamomyces</i> sp.	2	<i>Candida ponderosae</i> (AF271085) (91%)
<i>Yarrowia</i> sp.	1	<i>Candida hispaniensis</i> (KM510225) (88%)

ผลการจำแนกชนิดยีสต์ที่คัดแยกจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว (ตารางที่ 4 - 3) พบว่าจัดอยู่ใน 8 จีนัส 9 สปีชีส์ คือ *C. akabanensis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus humicola*, *Cry. laurentii*, *Cyberlindnera subsufficiens*, *Saccharomycopsis fermentans*, *Sch. vanrijiae*, *T. mycotoxinivorans* และ *W. sydowiorum* โดยพบยีสต์ *C. akabanensis* มากที่สุดคิดเป็น 15.79% นอกจากนี้ยังพบว่ามีไอโซเลต NG4.3, NG5, NG6; NG10, NG12 และ NG17 อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ในจีนัส *Kurtzmaniella*, *Wickerhamomyces* และ *Yarrowia* ตามลำดับ

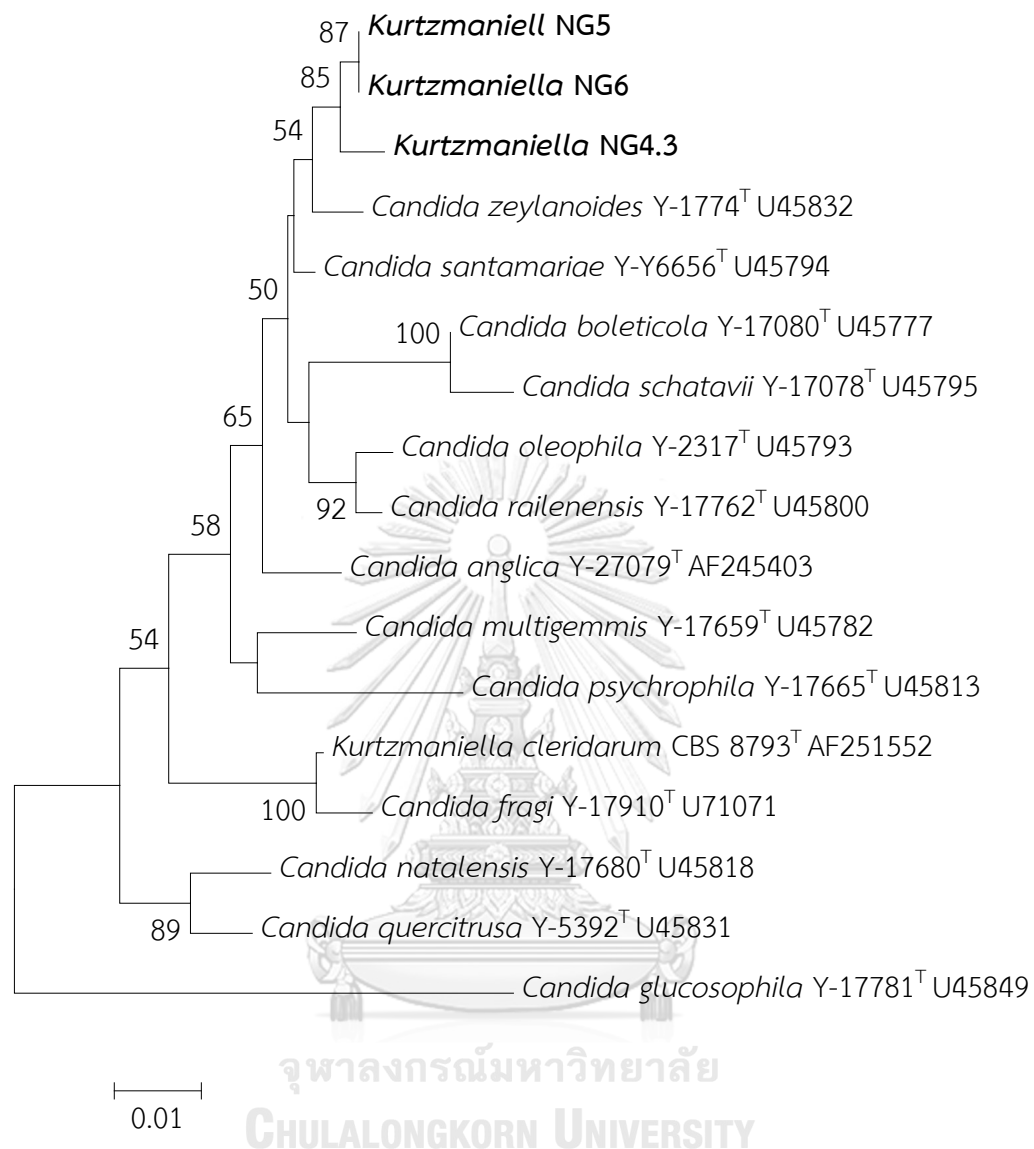
ไอโซเลต NG4.3, NG5 และ NG6 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณโคนต้นไม้ เศษไม้ผู้พงปนกับคราบแมลง และเปลือกไม้ ตามลำดับ จัดอยู่ใน *Kurtzmaniella* clade โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU มีความเหมือนกับ *C. zeylanoide* มากที่สุด การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีสต์อื่นในฐานข้อมูลออนไลน์ GenBank พบว่าไอโซเลต NG4.3 มีนิวคลีโอไทด์ต่างจาก *C. zeylanoide* เท่ากับ 9 นิวคลีโอไทด์ หรือมีความเหมือน 98% ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง D1/D2 ของไอโซเลต NG5 และ NG6 เหมือนกัน 100% แต่มีนิวคลีโอไทด์ต่างจาก *C. zeylanoide* เท่ากับ 6 นิวคลีโอไทด์ หรือมีความเหมือน 99% และมีนิวคลีโอไทด์ต่างจากไอโซเลต NG4.3 เท่ากับ 5 นิวคลีโอไทด์ จึงคาดว่าทั้งสามไอโซเลตเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกัน จากแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการพบว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์นี้แยกออกจากกันอย่างชัดเจนด้วยค่า Bootstrap มากกว่า 85% (รูปที่ 4 - 3)

ไอโซเลต NG10 และ NG12 ซึ่งแยกได้จากดินใต้ต้นไม้ริมและมอสที่เจริญพร้อมกับไลเคน ตามลำดับ จัดอยู่ใน *Wickerhamomyces* clade เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง D1/D2 พบว่ายีสต์ทั้งสองสายพันธุ์อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง D1/D2 ของไอโซเลต NG10 และ NG12 มีความเหมือนกัน 99% แต่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. ponderosae* เพียง 91% ไอโซเลต NG10 และ NG12 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจาก *C. ponderosae* เท่ากับ 42 และ 37 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ จากแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการพบว่ายีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตแยกออกจากสปีชีส์ใกล้เคียงอย่างชัดเจนด้วยค่า Bootstrap เท่ากับ 100% (รูปที่ 4 - 4)

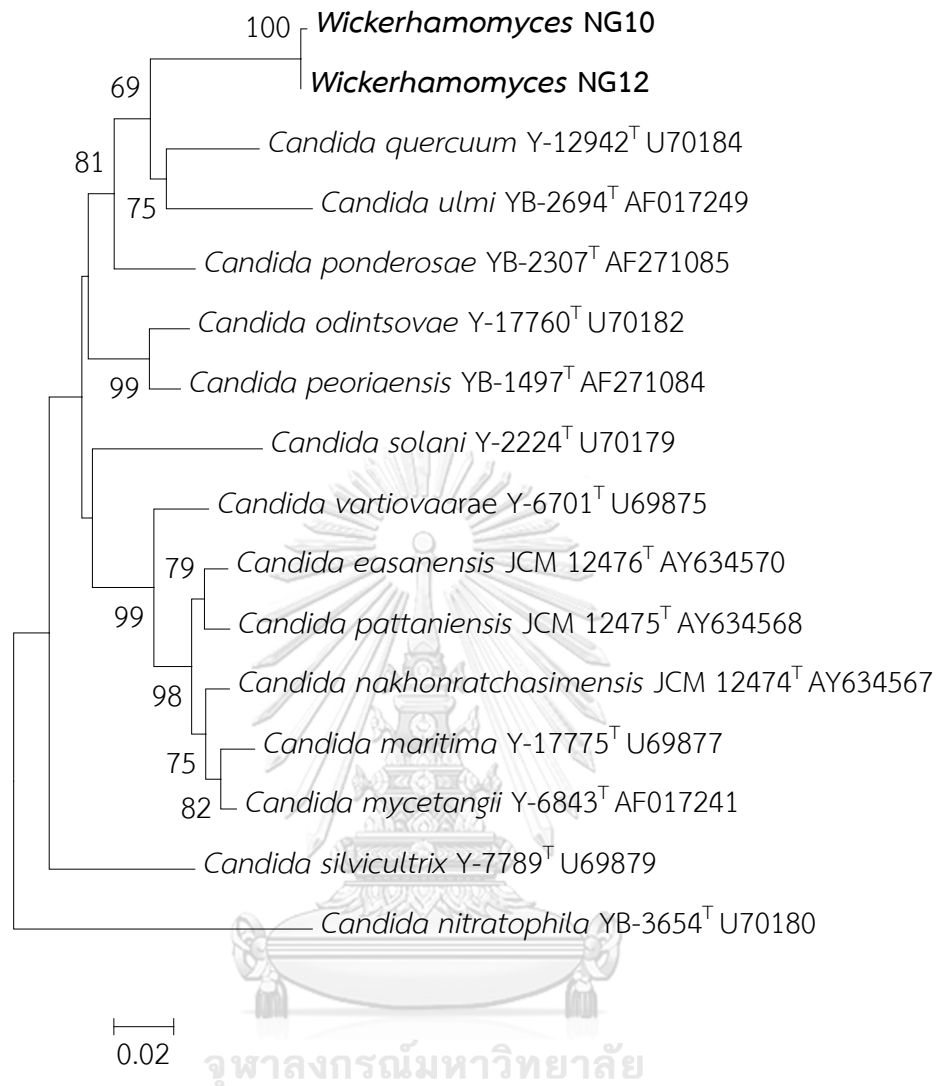
ไอโซเลต NG17 ที่แยกได้จากดินรังปลวก จัดอยู่ใน *Yarrowia* clade โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง D1/D2 ใกล้เคียงกับ *C. hispaniensis* มากที่สุด (ความเหมือน 88%) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากของ *C. hispaniensis* เท่ากับ 36 นิวคลีโอไทด์ และต่างจากของ *Aciculoconidium aculeatum* เท่ากับ 33 นิวคลีโอไทด์ (ความเหมือน 87%) จากแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการพบว่าไอโซเลต NG17 แยกออกจาก *A. aculeatum* อย่างชัดเจนด้วยค่า Bootstrap เท่ากับ 75% (รูปที่ 4 - 5)



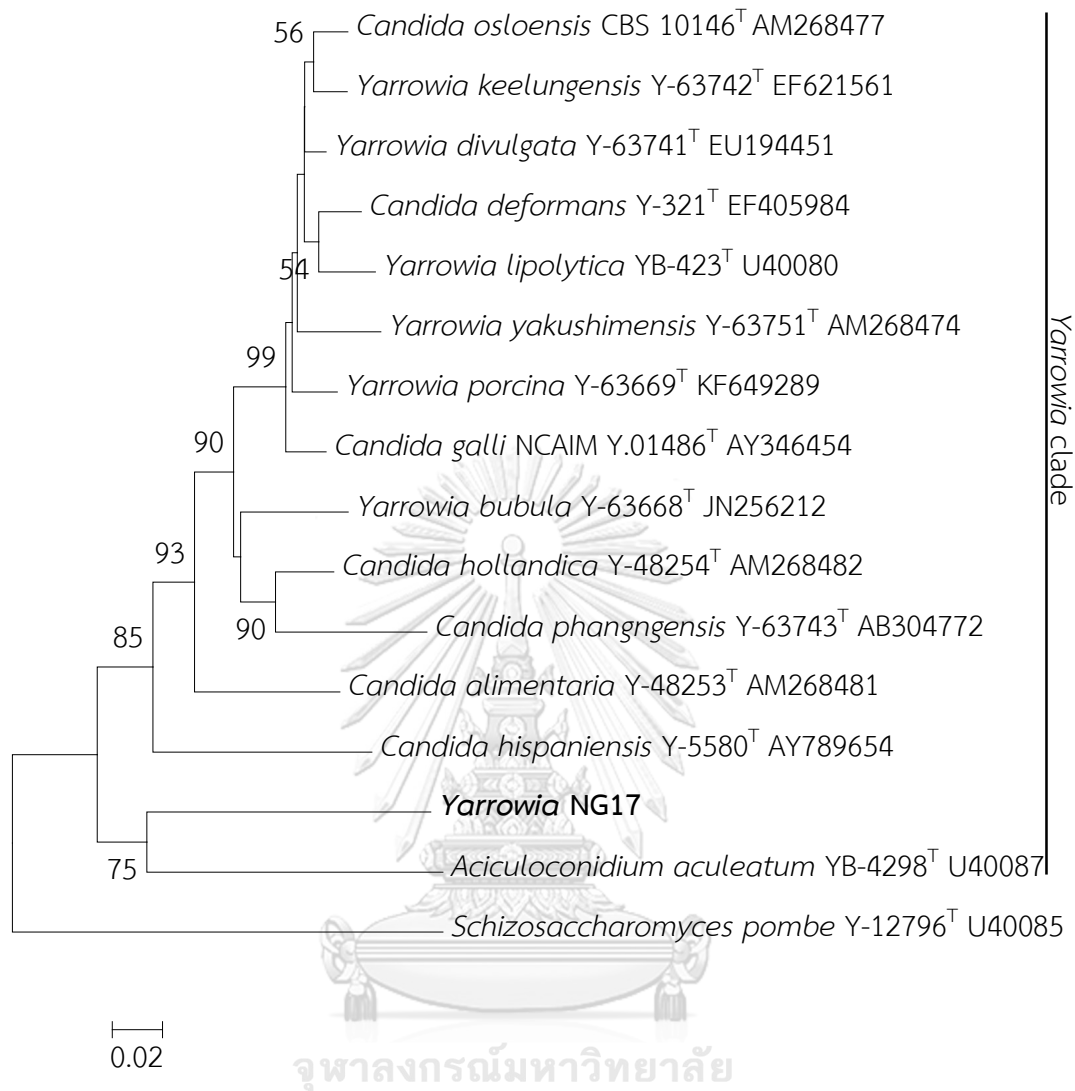
รูปที่ 4 - 2 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Candida* MG11-13.3 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยยกการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ *C. pinguabensis* เป็น out group



รูปที่ 4 - 3 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Kurtzmaniella* NG4.3, NG5 และ NG6 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ *C. glucosophila* เป็น out group



รูปที่ 4 - 4 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Wickerhamomyces* NG10 และ NG12 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ *C. nitratophila* เป็น out group



รูปที่ 4 - 5 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Yarrowia* NG17 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ *Schi. pombe* เป็น out group

4.2 ผลการคัดกรองยีสต์สะสมไขมันภายในเซลล์

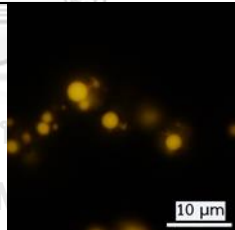
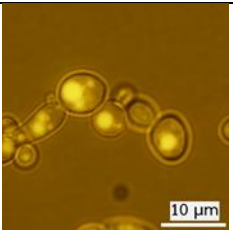
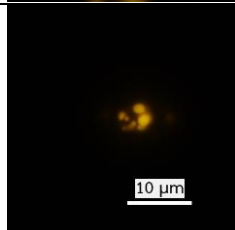
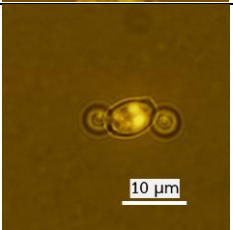
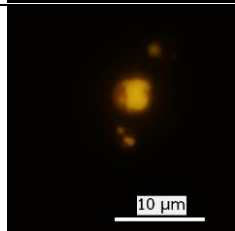
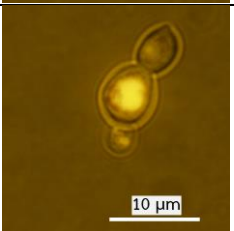
ผลการตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ทั้งหมดจำนวน 106 สายพันธุ์ (strain) ที่คัดแยกได้จากข้อ 4.1.1 โดยการย้อมเซลล์ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ไนล์เรด เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เปรียบเทียบกับ *Lipomyces starkeyi* JCM 5995 ซึ่งเป็นยีสต์โอลิจินัสยีสต์จำนวน 24 สายพันธุ์ เห็นสีเหลืองทองภายในเซลล์มากกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่เซลล์ (ตารางที่ 4 - 7) โดยเป็นยีสต์ที่แยกได้จากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *K. aestuarii* MG1-1, *K. aestuarii* MG1-7, *K. aestuarii* MG1-12.2, *K. aestuarii* MG1-8w.3 และ *C. tropicalis* MG1-8 ยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lac. thermotolerans* MG11-17.2, *C. orthopsilosis* MG11-11.3, *R. mucilaginosa* MG11-2.3, *T. mycotoxinivorans* MG11-12.3, *C. tropicalis* MG11-4.1, *C. tropicalis* MG11-8.2, *C. tropicalis* MG11-17.3, *C. tropicalis* MG11-4w.2, *C. tropicalis* MG11-20w.2 และ *C. tropicalis* MG11-20w.4 และยีสต์ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Yarrowia* sp. NG17, *Cyb. subsufficiens* NG8.2, *Cry. humicola* NG2, *Cry. laurentii* NG22, *Kurtzmaniella* NG4.3, *Kurtzmaniella* NG5, *Kurtzmaniella* NG6, *T.n mycotoxinivorans* NG4.1 และ *C. tropicalis* NG21

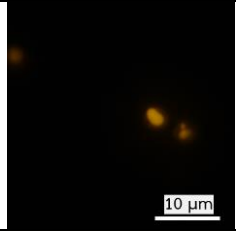
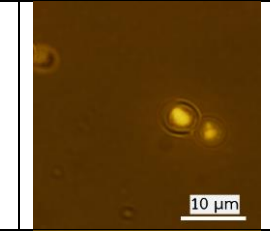
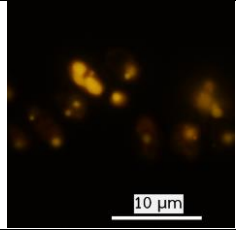
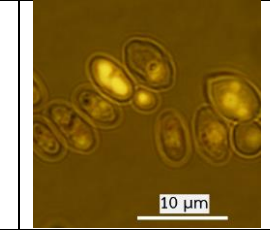
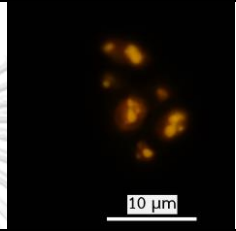
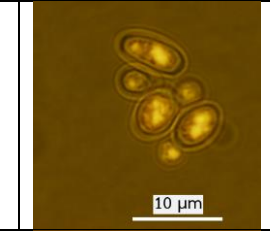
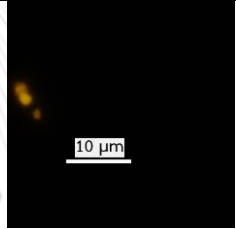
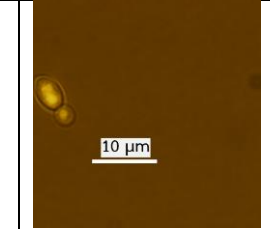
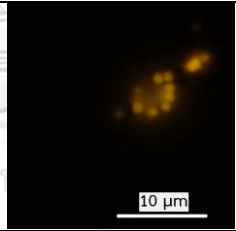
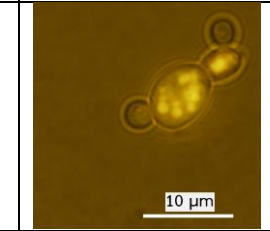
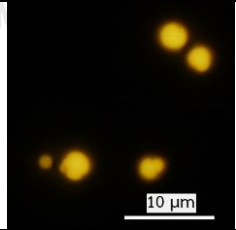
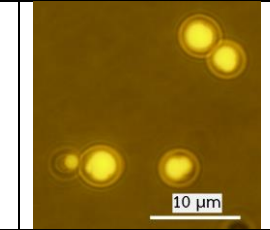
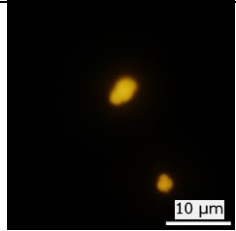
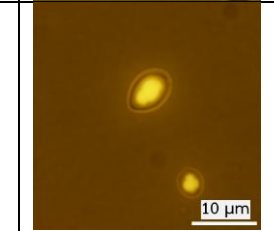
ลักษณะการสร้างลิพิดบอดีของยีสต์แต่ละสปีชีส์แตกต่างกัน คือ *C. tropicalis*, *Cry. laurentii*, *K. aestuarii* ทั้ง 4 สายพันธุ์, *Lac. thermotolerans* MG11-17.2 และ *T. mycotoxinivorans* ทั้ง 2 สายพันธุ์ สร้างลิพิดบอดีลักษณะทรงกลม (spherical) ขนาดเล็กภายในเซลล์ มีจำนวนตั้งแต่ 1-10 ลิพิดบอดี ในขณะที่ *C. orthopsilosis*, *Cry. humicola*, *Cyb. subsufficiens* NG8.2, *Kurtzmaniella* sp. NG4.3 ทั้ง 3 สายพันธุ์, *R. mucilaginosa* MG11-2.3 และ *Yarrowia* sp. NG17 ลิพิดบอดีมีขนาดใหญ่ภายในเซลล์จำนวน 1-2 ลิพิดบอดี ซึ่งคล้ายกับลิพิดบอดีของ *L. starkeyi* JCM 5995 ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Arous และคณะ (ค.ศ. 2017) ซึ่งรายงานว่ายีสต์ต่างสปีชีส์ในจีนัส *Candida* และ *Pichia* จะมีการสร้างลิพิดบอดีที่แตกต่างกันที่ จำนวน ขนาด และตำแหน่งของลิพิดบอดี

จุลินทรีย์ที่เจริญในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไปและมีปริมาณไนโตรเจนจำกัดจะสะสมไขมัน (lipid) ภายในเซลล์ (Ageitos และคณะ, 2011) ในสภาพลิพิดบอดี (lipid bodies) (Poontawee และคณะ, 2017) การย้อมไขมันในเซลล์แมโครเฟจ (macrophage) ด้วยสีไนล์เรด แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์แล้วเห็นลิพิดบอดีเป็นสีเหลืองทอง (yellow-gold) ที่ช่วงคลื่น excitation ที่ 450–500 นาโนเมตร และ emission ที่ >528 นาโนเมตร ทั้งนี้ไนล์เรดละลายได้ในไขมันแต่ไม่ติดสีส่วนอื่นของเซลล์ นับเป็นเทคนิคการย้อมไขมันด้วยสีไนล์เรดที่รายงาน

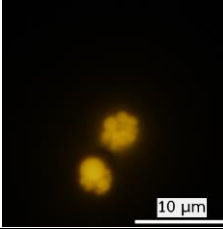
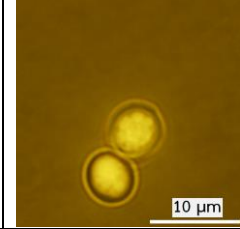
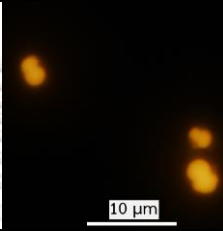
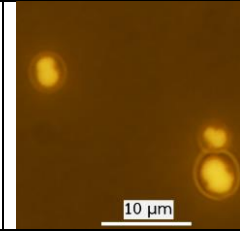
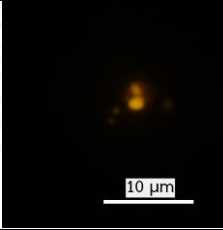
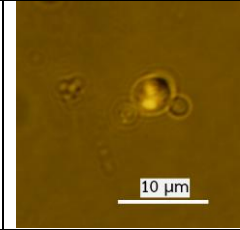
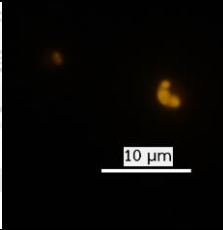
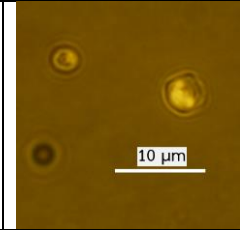
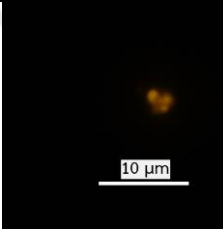
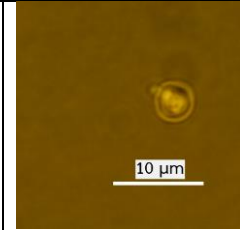
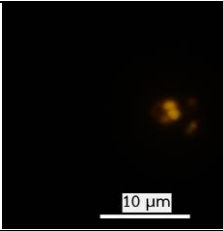
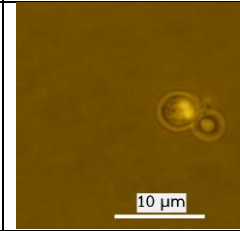
เป็นครั้งแรก (Greenspan และคณะ, 1985) ต่อมามีการพัฒนาให้วิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยการเติมสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) เพื่อช่วยให้สีย้อมซึมผ่านเซลล์ได้ดีขึ้น (Sitepu และคณะ, 2012) โดยทั่วไปความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ของไนล์เรดขึ้นอยู่กัขนิตของกรดไขมัน เมื่อละลายในกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ความเข้มแสงจะมากกว่า (Fowler และคณะ, 1987) ปัจจุบันการย้อมลิพิดด้วยสียไนล์เรดเป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อการคัดกรองยีสต์โพลิจินัสเบื้องต้นเนื่องจากรวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม (traditional method) ที่ต้องผ่านหลายขั้นตอน เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ การทำให้เซลล์แห้ง และการสกัดน้ำมันจากเซลล์แห้ง เป็นต้น (Kimura และคณะ, 2004) โดย Wang และคณะ (2017) ใช้วิธีการย้อมน้ำมันด้วยไนล์เรดในการคัดกรองยีสต์จำนวน 10 ไอโซเลต พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลตที่ให้ผลเป็นบวก เช่นเดียวกับกับ Poontawee และคณะ (2017) ที่คัดกรองยีสต์ได้จำนวน 142 ไอโซเลต จากทั้งหมด 418 ไอโซเลต โดยใช้วิธีย้อมด้วยสียไนล์เรดแล้วเลือกไอโซเลตที่สังเกตเห็นลิพิดบอดีขนาดใหญ่จำนวนมากภายในเซลล์ มาศึกษาหาปริมาณน้ำมันต่อในฟลากส์เซีย

ตารางที่ 4 - 7 แสดงลักษณะลิพิดบอดีในเซลล์ที่ย้อมติดสียไนล์เรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

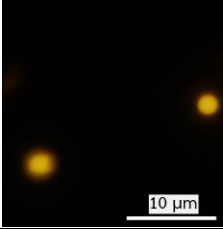
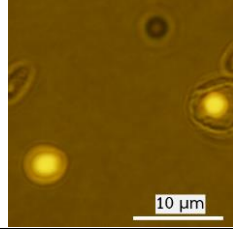
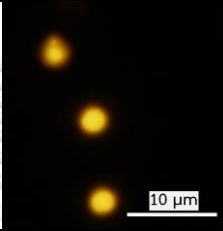
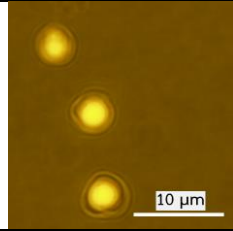
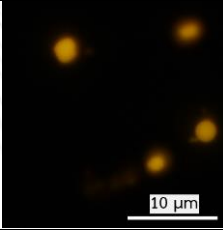
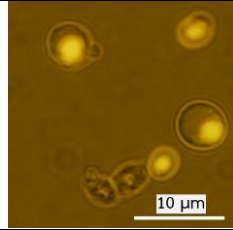
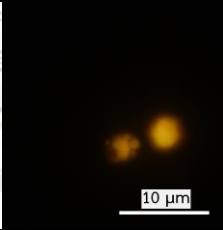
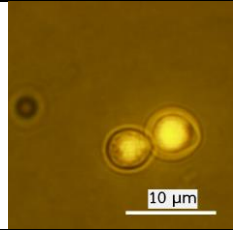
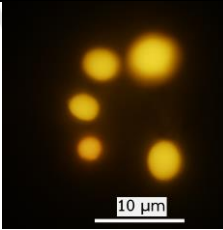
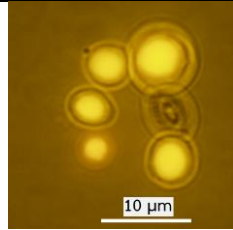
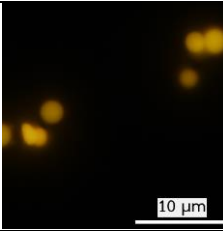
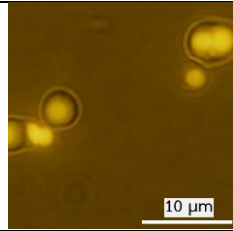
ไอโซเลต (สถานที่เก็บตัวอย่าง)	แสงฟลูออเรสเซนซ์	แสงฟลูออเรสเซนซ์ และแสงขาว
<i>Candida tropicalis</i> NG21 (อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว)		
<i>Candida tropicalis</i> MG1-8 (สถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1)		
<i>Candida tropicalis</i> MG11-4.1 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)		

<p><i>Candida tropicalis</i> MG11-8.2 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)</p>		
<p><i>Candida tropicalis</i> MG11-17.3 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)</p>		
<p><i>Candida tropicalis</i> MG11-4w.2 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)</p>		
<p><i>Candida tropicalis</i> MG11-20w.2 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)</p>		
<p><i>Candida tropicalis</i> MG11-20w.4 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)</p>		
<p><i>Candida orthopsilosis</i> MG11-11.3 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)</p>		
<p><i>Cryptococcus humicola</i> NG2 (อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว)</p>		

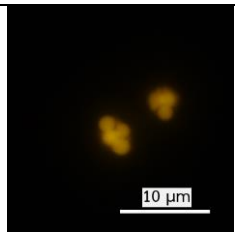
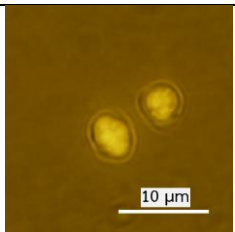
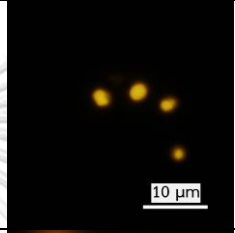
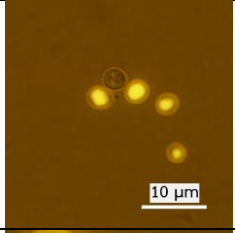
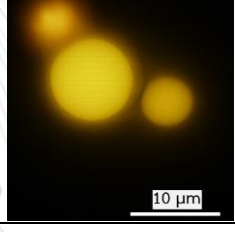
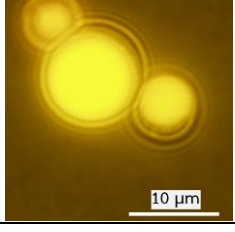
ตารางที่ 4 - 7 แสดงลักษณะไขมันในเซลล์ที่ย้อมติดสียไนล์เรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ต่อ)

ไอโซเลต (สถานที่เก็บตัวอย่าง)	แสงฟลูออเรสเซนซ์	แสงฟลูออเรสเซนซ์และแสงขาว
<i>Cryptococcus laurentii</i> NG22 (อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว)		
<i>Cyberlindnera subsufficiens</i> NG8.2 (อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว)		
<i>Kluyveromyces aestuarii</i> MG1-1 (สถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1)		
<i>Kluyveromyces aestuarii</i> MG1-7 (สถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1)		
<i>Kluyveromyces aestuarii</i> MG1-12.2 (สถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1)		
<i>Kluyveromyces aestuarii</i> MG1-8w.3 (สถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1)		

ตารางที่ 4 - 7 แสดงลักษณะไขมันในเซลล์ที่ย้อมติดสียไนล์เรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ต่อ)

ไอโซเลต (สถานที่เก็บตัวอย่าง)	แสงฟลูออเรสเซนซ์	แสงฟลูออเรสเซนซ์และแสงขาว
<i>Kurtzmaniella</i> NG4.3 (อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว)		
<i>Kurtzmaniella</i> NG5 (อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว)		
<i>Kurtzmaniella</i> NG6 (อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว)		
<i>Lachancea thermotolerans</i> MG11-17.2 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> MG11-2.3 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)		
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> NG4.1 (อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว)		

ตารางที่ 4 - 7 แสดงลักษณะไขมันในเซลล์ที่ย้อมติดสีไนล์เรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ต่อ)

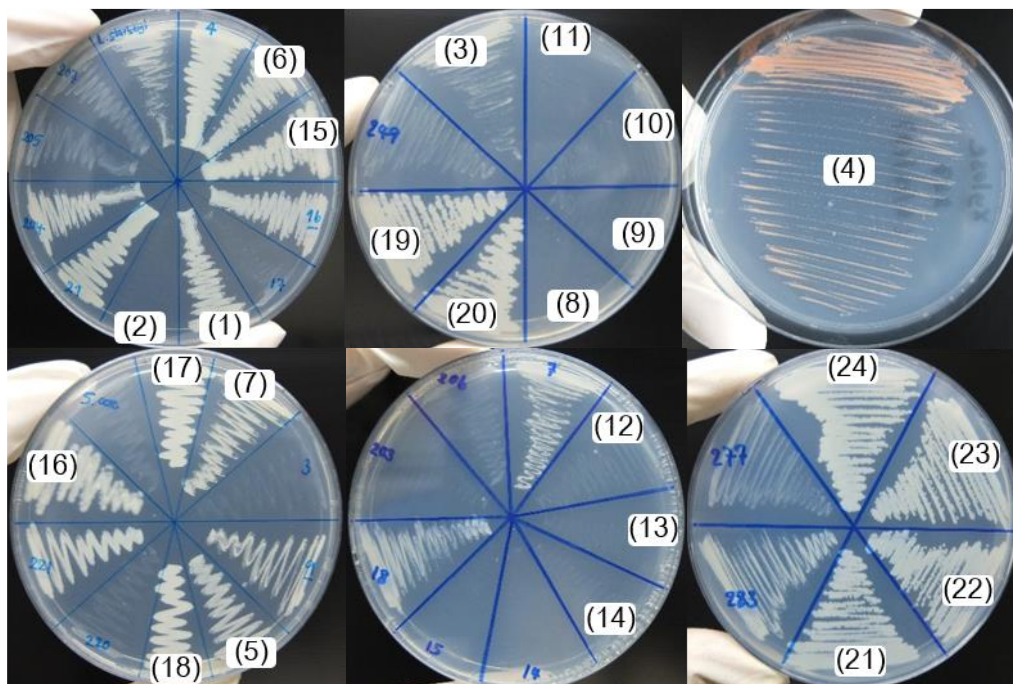
ไอโซเลต (สถานที่เก็บตัวอย่าง)	แสงฟลูออเรสเซนซ์	แสงฟลูออเรสเซนซ์และแสงขาว
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> MG11-12.3 (สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11)		
<i>Yarrowia</i> sp. NG17 (อุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว)		
<i>Lipomyces starkeyi</i> JCM 5995 (ชุดควบคุมบวก)		

4.3 ผลการคัดกรองยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญ

ผลการนำยีสต์ที่สะสมน้ำมันภายในเซลล์ที่คัดเลือกได้จำนวน 24 สายพันธุ์ (จากข้อ 4.3) มาทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญบนอาหารแข็งพบว่ามียีสต์จำนวน 16 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia* NG17, *C. orthopsilosis* MG11-11.3, *R. mucilaginosus* MG11-2.3, *Cyb. subsufficiens* NG8.2, *Cry. humicola* NG2, *Cry. laurentii* NG22, *T. mycotoxinivorans* NG4.1, *T. mycotoxinivorans* 11-12.3, *C. tropicalis* NG21, *C. tropicalis* MG1-8, *C. tropicalis* MG11-4.1, *C. tropicalis* MG11-8.2, *C. tropicalis* MG11-17.3, *C. tropicalis* MG11-4w.2, *C. tropicalis* MG11-20w.2 และ *C. tropicalis* MG11-20w.4 สามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวเพื่อการเจริญได้

น้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลักของไฮโดรไลเสตไบอ้อยซึ่งจะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของยีสต์ในงานวิจัยนี้ Jutakanoke และคณะ (2012) รายงานว่าไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่เตรียมโดยการปรับสภาพไบอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 9.8 กรัม/ลิตร และ 9.0

กรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของยีสต์จึงคัดกรองยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญ



รูปที่ 4 - 6 แสดงการเจริญของ *Yarrowia* NG17 (1), *Lac. thermotolerans* MG11-17.2 (2), *C. orthopsilosis* MG11-11.3 (3), *R. mucilaginosus* MG11-2.3 (4), *Cyb. subsufficiens* NG8.2 (5), *Cry. humicola* NG2 (6), *Cry. laurentii* NG22 (7), *K. aestuarii* MG1-1 (8), *K. aestuarii* MG1-7 (9), *K. aestuarii* MG1-12.2 (10), *K. aestuarii* MG1-8w.3 (11), *Kurtzmaniella* NG4.3 (12), *Kurtzmaniella* NG5 (13), *Kurtzmaniella* NG6 (14), *T. mycotoxinivorans* NG4.1 (15), *T. mycotoxinivorans* 11-12.3 (16), *C. tropicalis* NG21 (17), *C. tropicalis* MG1-8 (18), *C. tropicalis* MG11-4.1 (19), *C. tropicalis* MG11-8.2 (20), *C. tropicalis* MG11-17.3 (21), *C. tropicalis* MG11-4w.2 (22), *C. tropicalis* MG11-20w.2 (23), *C. tropicalis* MG11-20w.4 (24) บนอาหารไซโลส

4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์

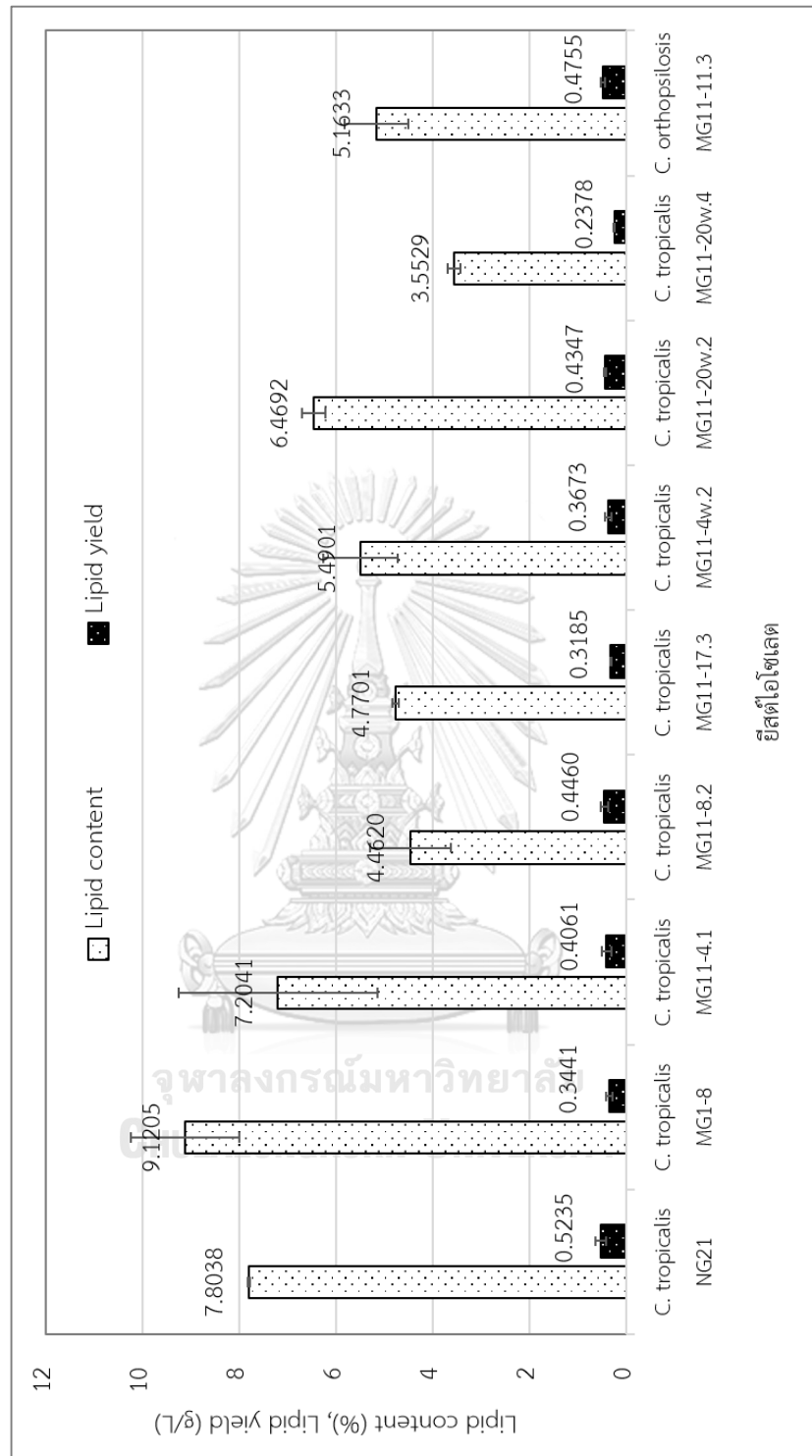
วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันของยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้จำนวน 16 สายพันธุ์ (จากข้อ 4.4) เมื่อเลี้ยงในอาหาร High C/N โดยใช้ *L. starkeyi* JCM 5995 เป็นยีสต์สายพันธุ์ควบคุม พบว่ายีสต์จำนวน 5 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติเป็นยีสต์โอเลจินัส (สะสมไขมันมากกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) คือ *Cry. humicola* NG2, *T. mycotoxinivorans* MG11-12.3, *Cyb.*

subsufficiens NG8.2, *R. mucilaginosa* MG11-2.3 และ *Yarrowia* NG17 ซึ่ง *Yarrowia* NG17 ผลิตน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 27.93% รองลงมาคือ *R. mucilaginosa* MG11-2.3 ผลิตน้ำมันได้ 25.31% ยีสต์โอลิจินัสทั้ง 5 สายพันธุ์ ผลิตน้ำมันได้น้อยกว่า *L. starkeyi* JCM 5995 (50.52%) เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำมันทั้งหมดที่ผลิตได้ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (lipid yield) พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกันคือ *Yarrowia* sp. ผลิตน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 5.07 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ *R. mucilaginosa* MG11-2.3 เท่ากับ 3.59 กรัม/ลิตร ซึ่งน้อยกว่าผลผลิตน้ำมันของ *L. starkeyi* JCM 5995 (8.61 กรัม/ลิตร) (รูปที่ 4 - 8) ยีสต์กลุ่ม *Candida* ทั้งหมดจำนวน 9 สายพันธุ์ ผลิตน้ำมันได้ไม่เกิน 10% (รูปที่ 4 - 7) โดยทั่วไปยีสต์โอลิจินัสอยู่ในจีนัส *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* และ *Trichosporon* สามารถสะสมไขมันได้ปริมาณสูงถึง 60-70% ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงในภาวะเหมาะสม (Ratledge และ Wynn, 2002) คุณสมบัติโอลิจินัสของยีสต์ (yeast oleaginity) ไม่ขึ้นกับสปีชีส์และสายพันธุ์ ผลการศึกษา ยีสต์ *Candida* มากกว่า 400 สปีชีส์ พบว่ามีเพียง 4 สปีชีส์เท่านั้นที่เป็นยีสต์โอลิจินัส (Sitepu และคณะ, 2014) Quarterman และคณะ (2017) เพาะเลี้ยง *Y. lipolytica* จำนวน 45 สายพันธุ์ ในไฮโดรไลเสตหญ้าสวิตช์ (Switchgrass) พบว่ามีเพียง 12 สายพันธุ์ เท่านั้นที่เป็นยีสต์โอลิจินัส ในงานวิจัยนี้คัดแยก *T. mycotoxinivorans* ได้จำนวน 2 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 1 สายพันธุ์ เท่านั้นคือ *T. mycotoxinivorans* MG11-12.3 ที่มีคุณสมบัติเป็นยีสต์โอลิจินัส

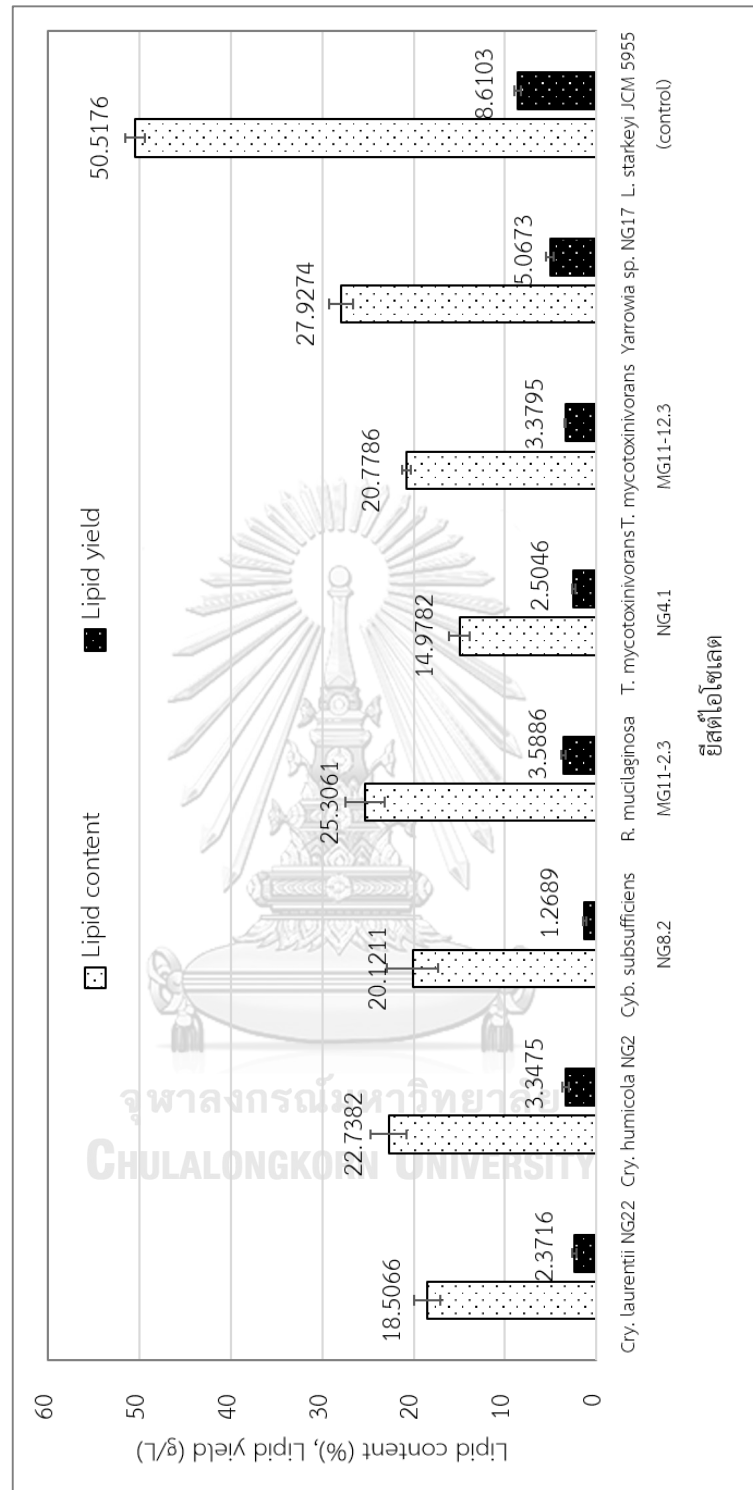
Michely และคณะ (2013) ศึกษายีสต์ใน *Yarrowia* clade จำนวน 9 สปีชีส์ พบว่ายีสต์ทุกสปีชีส์เป็นยีสต์โอลิจินัสเมื่อเลี้ยงในอาหารกรดไขมันโอเลอิก โดย *C. hispaniensis* CBS 9996 ผลิตน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 67% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่จากการศึกษาของ Quarterman และคณะ (2017) พบว่ายีสต์ใน *Yarrowia* clade เพียง 2 สปีชีส์ จากทั้งหมดจำนวน 13 สปีชีส์ ที่สะสมไขมันได้มากกว่า 20% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตหญ้าสวิตช์ โดย *C. phangngensis* PT1-17 ผลิตน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 43.2% น้ำหนัก/น้ำหนัก ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4 - 8

ยีสต์ *Cry. humicola* 10-1004 ผลิตน้ำมันได้ 35.48% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้น 120 กรัม/ลิตร และมีไนโตรเจนจำกัด (Sitepu และคณะ, 2013) Tanimura และคณะ (2014) รายงานว่า *Cry. musci* ผลิตน้ำมันได้ 44.7% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งในงานวิจัยนี้ *Cry. humicola* NG2 ผลิตน้ำมันได้ 22.74% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่ *Cry. laurentii* NG22 ซึ่งอยู่ใน *Bulleromyces* clade ไม่จัดเป็นยีสต์โอลิจินัสเนื่องจากผลิตน้ำมันได้ไม่ถึง 20% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 4 - 8) แสดงว่าคุณสมบัติความเป็นโอลิจินัสของยีสต์ไม่ขึ้นอยู่กับ clade (nonclade-specific) (Sitepu และคณะ, 2014) ยีสต์ *Cyb. subsufficiens* NG8.2 ผลิตน้ำมันได้ 20.12%

(น้ำหนักร/น้ำหนัก) ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง (รูปที่ 4 - 8) ซึ่งเป็นครั้งแรกที่ยีสต์สายพันธุ์นี้ถูกรายงานว่าเป็นยีสต์โอลิจินัส ซึ่งยีสต์ในจินัสนี้ที่เคยมีการรายงานว่าเป็นยีสต์โอลิจินัสคือ *Cyb. saturnus* CBS 5761 ผลิตน้ำมันได้ 25% (น้ำหนักร/น้ำหนัก) ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Sitepu และคณะ, 2014) และ *Cyb. jadinii* NRRL Y-1289 ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลในการเจริญ (Methanol-utilizing) ผลิตน้ำมันได้เท่ากับ 22% (น้ำหนักร/น้ำหนัก) ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง เมื่อเจริญในอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน (Jigami และคณะ, 1979) ยีสต์ *R. mucilaginosus* IIP32 ที่เจริญในไฮโดรไลเสตชานอ้อยที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร ในถังหมักแบบอากาศลอย (airlift bioreactor) ผลิตน้ำมันได้ 43% (น้ำหนักร/น้ำหนัก) ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง (Dasgupta และคณะ, 2017) งานวิจัยนี้พบว่า *T. mycotoxinivorans* MG11-12.3 สามารถผลิตน้ำมันได้ 20.78% (น้ำหนักร/น้ำหนัก) ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง (รูปที่ 4 - 8) นับเป็นครั้งแรกที่พบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้เป็นยีสต์โอลิจินัส แต่เนื่องจากยีสต์นี้สามารถก่อโรคระบบทางเดินหายใจ (respiratory pathogen) ในผู้ป่วยโรคซิสติก ไฟโบรซิส (cystic fibrosis) จึงไม่นำยีสต์สายพันธุ์นี้มาศึกษาต่อ (Hickey และคณะ, 2009) ยีสต์ที่นำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไปมี 4 สายพันธุ์คือ *Cry. humicola* NG2, *Cyb. subsufficiens* NG8.2, *R. mucilaginosus* MG11-2.3 และ *Yarrowia* NG17



รูปที่ 4 - 7 ปริมาณน้ำมันของ *C. tropicalis* สายพันธุ์ NG21 MG1-8 MG11-4.1 MG11-8.2 MG11-17.3 MG11-4w.2 MG11-20w.2 MG11-20w.4 และ *C. orthopsilosis* MG11-11.3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร High C/N



รูปที่ 4 - 8 ปริมาณน้ำมันของ *Cry. laurentii* NG22, *Cry. humicola* NG2, *T. mycotoxinivorans* สายพันธุ์ NG4.1, MG11-12.3, *Cyb. subsufficiens* NG8.2, *R. mucilaginosa* MG11-2.3 และ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในอาหาร High C/N

ตารางที่ 4 - 8 ปริมาณการผลิตน้ำมันของยีสต์ตามลำดับอนุกรมวิธาน

อนุกรมวิธาน	ยีสต์	ปริมาณน้ำมัน (อ้างอิง)
ไฟลัม Ascomycota		
ชั้น Saccharomycetes		
อันดับ Saccharomycetales		
วงศ์ Wickerhamomycetaceae		
วงศ์ Debaromycetaceae (Lodderomyces-Spathaspora clade)	<p><i>Cyberlindnera saturnus</i> CBS 5761</p> <p><i>Candida freyschussii</i> DBVPG-6208</p> <p><i>Cyberlindnera subsufficiens</i> NG8.2</p> <p><i>Candida tropicalis</i></p> <p><i>Candida tropicalis</i> 8 สายพันธุ์</p> <p><i>Candida orthopsilosis</i> Y09GS34</p> <p><i>Candida orthopsilosis</i> MG11-11.3</p>	<p>25% (Boulton และ Ratledge, 1981)</p> <p>32% (Amaretti และคณะ, 2012)</p> <p>20.12% (งานวิจัยนี้)</p> <p>23% (Andreevskaia และ Zalashko, 1979)</p> <p>3.55-9.12% (งานวิจัยนี้)</p> <p>63.75% (Kanti และ Sudiana, 2015)</p> <p>5.16% (งานวิจัยนี้)</p>
อันดับ Saccharomycetales		
วงศ์ Dipodascaceae (<i>Yarrowia</i> clade)	<p><i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 7504</p> <p><i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 7504</p> <p><i>Yarrowia deformans</i> CBS 2071</p> <p><i>Candida hispaniensis</i> CBS 9996</p> <p><i>Candida phangngensis</i> Y-63743</p> <p><i>Yarrowia</i> sp. NG17</p>	<p>52.2% (Michely และคณะ, 2013)</p> <p>15.0% (Quarterman และคณะ, 2017)</p> <p>34.4% (Michely และคณะ, 2013)</p> <p>67.1% (Michely และคณะ, 2013)</p> <p>43.2% (Quarterman และคณะ, 2017)</p> <p>27.93% (งานวิจัยนี้)</p>

ตารางที่ 4 - 8 ปริมาณการผลิตน้ำมันของยีสต์ตามลำดับอนุกรมวิธาน (ต่อ)

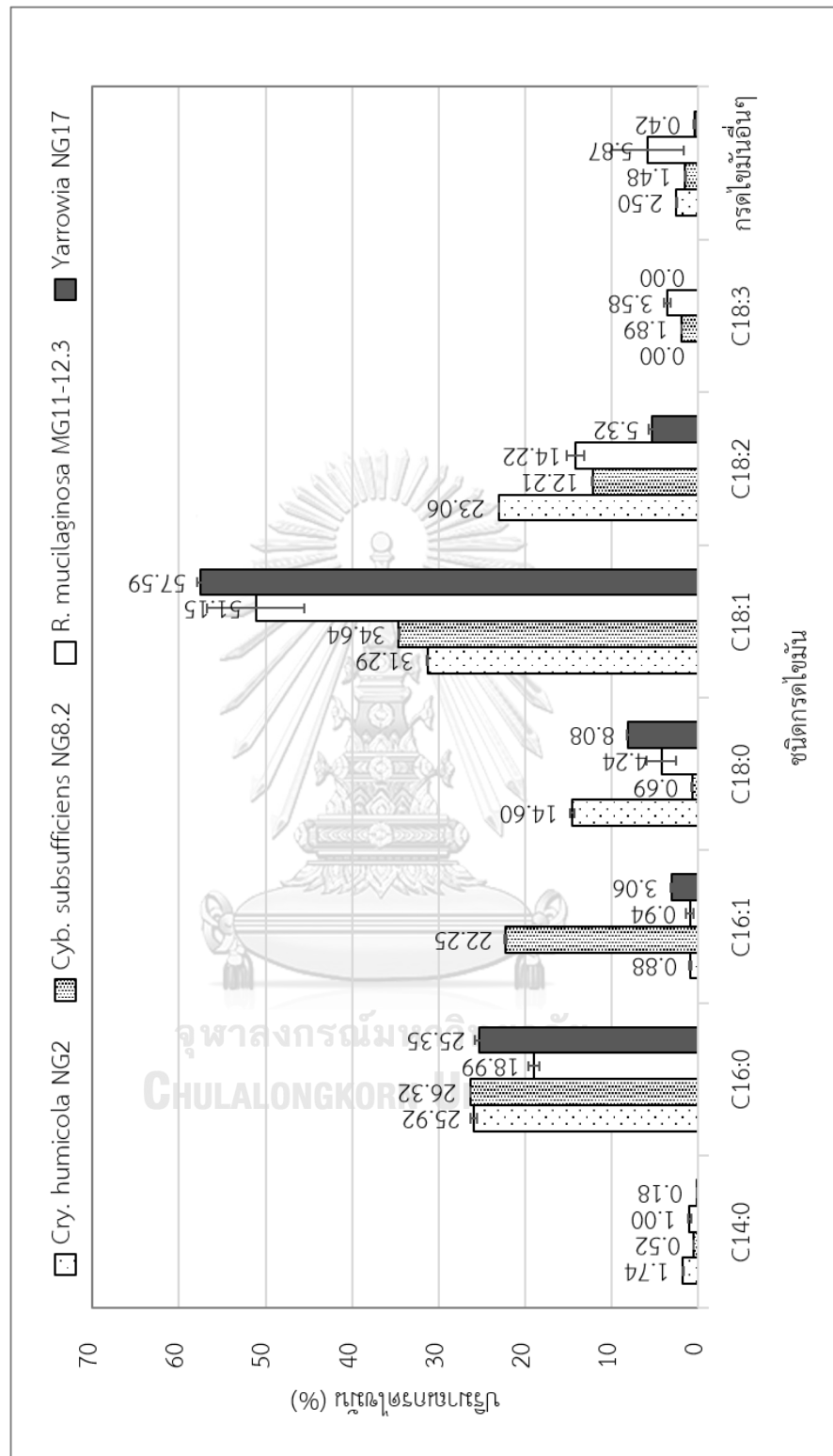
อนุกรมวิธาน	ยีสต์	ปริมาณน้ำมัน (อ้างอิง)
ไฟลัม Basidiomycota ชั้น Microbotryomycetes อันดับ Sporidiobolales (<i>Rhodosporiidium</i> clade) ชั้น Tremellomycetes อันดับ Tremellales (<i>Bulleromyces</i> clade) อันดับ Trichosporonales (<i>Trichosporon gracile</i> clade) (<i>Cryptococcus humicola</i> clade)	<i>Rhodosporiidium sphaerocarpum</i> UCDFST 68-43 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> UCDFST 40-129 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> MG11-2.3 <i>Cryptococcus laurentii</i> UCDFST 68-684.1 <i>Cryptococcus laurentii</i> NG22 <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> MG11-12.3 <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> NG4.1 <i>Cryptococcus humicola</i> UCDFST 10-1004 <i>Cryptococcus humicola</i> NG2 <i>Cryptococcus musci</i> JCM 24512	15-37% (Sitepu และคณะ, 2013) 33% (Sitepu และคณะ, 2012) 25.31% (งานวิจัยนี้) 31.3 % (Sitepu และคณะ, 2014) 18.51% (งานวิจัยนี้) 20.78% (งานวิจัยนี้) 14.98% (งานวิจัยนี้) 35.48% (Sitepu และคณะ, 2013) 22.74% (งานวิจัยนี้) 44.7% (Tanimura และคณะ, 2014)

4.5 ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันยีสต์ที่เตรียมได้

ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันยีสต์โอลิจินัสที่คัดกรองได้จากข้อ 4.5 (รูปที่ 4 - 9) คือ *Cry. humicola* NG2, *Cyb. subsufficiens*, *R. mucilaginosa* MG11-2.3 และ *Yarrowia* NG17 พบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันยีสต์ทุกสายพันธุ์คือ กรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) รองลงมาคือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid; C16:0) น้ำมันของ *Yarrowia* NG17 มีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ กรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติก โดยมีกรดโอเลอิกสูงที่สุดเท่ากับ 57.59% ของกรดไขมันทั้งหมด น้ำมันของ *R. mucilaginosa* MG11-2.3 มีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ กรดโอเลอิก กรดปาล์มิติก และกรดลิโนเลอิก (linoleic acid; C18:2) เท่ากับ 51.15% 18.99 และ 14.22% ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ น้ำมันของ *Cry. humicola* NG2 และ *Cyb. subsufficiens* NG8.2 มีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักเหมือนกับ *R. mucilaginosa* MG11-2.3 คือ กรดโอเลอิก กรดปาล์มิติก และกรดลิโนเลอิก แต่มีความแตกต่างคือน้ำมันของ *Cry. humicola* NG2 และ *Cyb. subsufficiens* NG8.2 มีกรดสเตียริก (stearic acid; C18:0) และกรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid; C16:1) เป็นองค์ประกอบหลักเพิ่มอีก 1 ชนิด เท่ากับ 14.60% และ 22.25% ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ

Sitepu และคณะ (2013) ศึกษาชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์โอลิจินัสและยีสต์ที่ไม่เป็นยีสต์โอลิจินัส (non-oleaginous yeast) โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีคาร์บอนมากเกินไป แต่มีไนโตรเจนในปริมาณจำกัด วิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของด้วยวิธี GC-FID (Gas Chromatography- Flame Ionization Detector) พบว่ามีกรดไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก 4 ชนิด คือ กรดโอเลอิก (C18:1) กรดปาล์มิติก (C16:0) กรดสเตียริก (C18:0) และกรดลิโนเลอิก (18:2) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้ถูกพบว่าเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันพืชเช่นกัน เช่น น้ำมันคาโนลา (canola oil) น้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower oil) (Ageitos และคณะ, 2011) เป็นต้น กรดไขมันชนิดอื่นๆ ที่อาจพบในน้ำมันของยีสต์ เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) กรดไมริสติก (myristic acid; C14:0) และกรดลิโนเลนิก (linolenic acid; C18:3) เป็นต้น

น้ำมันของยีสต์นอกจากการนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซลแล้ว เนื่องจากกรดไขมันบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันยีสต์ เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก เป็นกรดไขมันที่มีมูลค่าสูง จัดเป็นกรดไขมันที่ดีสำหรับผู้ป่วยโรคอ้วนเพราะช่วยป้องกันโรคสมองและโรคหลอดเลือดหัวใจอาจนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ (Yang และคณะ, 2011)



รูปที่ 4 - 9 ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์โอลิจินัสที่คัดกรองได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร High C/N

4.6 ผลการเตรียมไฮโดรไลเสตใบอ้อย

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของใบอ้อย (*Saccharum officinarum*) พันธุ์ L.CSB06-2-15 ตามวิธีมาตรฐาน Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI) โดยกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี องค์ประกอบหลักคือ เซลลูโลส 38.8% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) รองลงมาคือเฮมิเซลลูโลส 23.5% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และลิกนิน เท่ากับ 13.8% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (ตารางที่ 4 - 9) ใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของใบอ้อยจากจังหวัด นครราชสีมา ซึ่งมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 38.5% 23% และ 15.6% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ (Jutakanoke และคณะ, 2012)

ตารางที่ 4 - 9 องค์ประกอบของใบอ้อย

องค์ประกอบ	ร้อยละของน้ำหนักใบอ้อย
เซลลูโลส	38.8
เฮมิเซลลูโลส	23.5
ลิกนิน	13.8
ปริมาณเถ้า	11.4

ผลการวิเคราะห์ไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่เตรียมโดยการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 30 นาที แล้วย่อยต่อด้วย เอนไซม์เซลลูเลส 0.25 มิลลิลิตร/กรัม ที่ 50°C นาน 6 ชั่วโมง โดยใบอ้อยย่อยใบอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 12% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่ามีน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ได้ เท่ากับ 18.7 กรัม/ลิตร และ 19.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด เท่ากับ 0.6 กรัม/ลิตร ปริมาณเฟอร์ฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (Hydroxymethylfurfural; HMF) เท่ากับ 0.13 กรัม/ลิตร และ 0.30 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4 - 10) เมื่อนำไฮโดรไลเสตใบอ้อยมากำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ด้วยวิธีปรับต่างเกิน พบว่า เฟอร์ฟูรัลลดลงเหลือ 0.10 กรัม/ลิตร คิดเป็นลดลง 23.08% การกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ โดยวิธีปรับต่างเกินนี้ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสในไฮโดรไลเสตใบอ้อยลดลงเหลือ 18.0 กรัม/ลิตร และ 18.5 กรัม/ลิตร หรือลดลง 3.74% และ 3.14% ตามลำดับ Huang และคณะ (2012) รายงานว่าวิธีปรับต่างเกินเพื่อกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ในไฮโดรไลเสตขานอ้อย นอกจากทำให้ปริมาณเฟอร์ฟูรัลลดลง 50% ยังทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสในไฮโดรไลเสตขานอ้อยลดลงด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 4 - 10 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส ไนโตรเจน และสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ในไฮโดรไลเสตใบอ้อย

องค์ประกอบ	ไฮโดรไลเสต	
	NDSLH*	DSLH**
น้ำตาลที่ยีสต์ใช้ได้ (กรัม/ลิตร)		
กลูโคส	18.7±0.0	18.0±0.3
ไซโลส	19.1±0.3	18.5±0.0
ไนโตรเจน (กรัม/ลิตร)	0.6±0.0	0.6±0.0
สารยับยั้งการเจริญ (กรัม/ลิตร)		
เพอร์ฟูรัล	0.13	0.10
ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล	0.30	0.29
คาร์บอน : ไนโตรเจน***	63	60.83

* NDSLH คือ ไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ไม่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์

** DSLH คือ ไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์

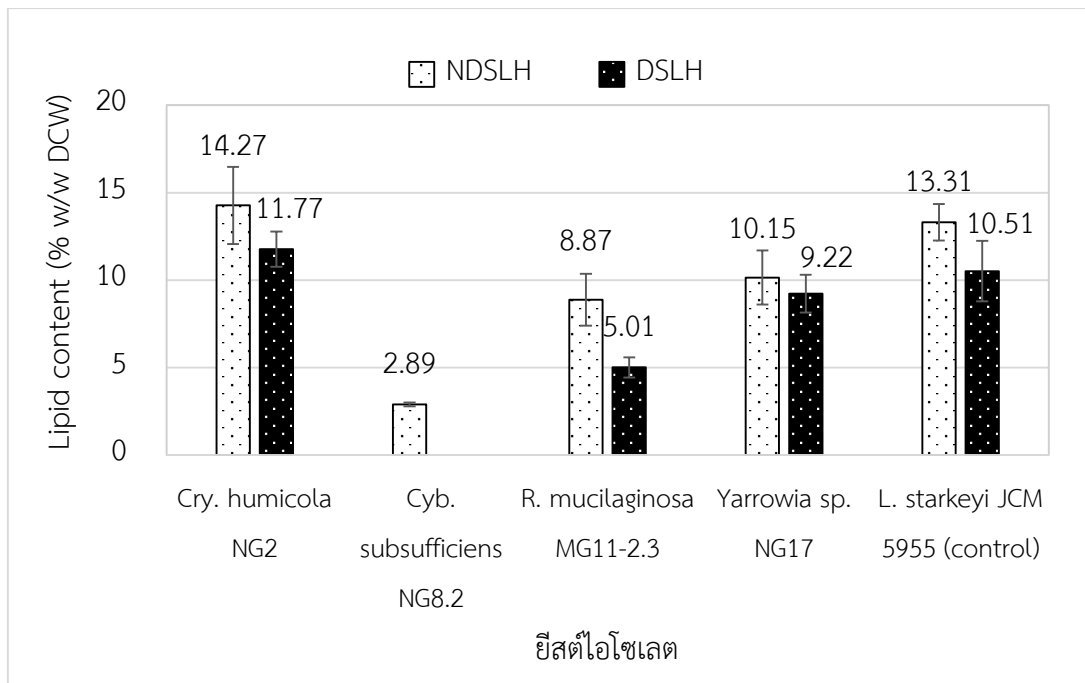
*** อัตราส่วนของ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส : ไนโตรเจน

4.7 ผลการผลิตน้ำมันของยีสต์โอลิจินัสจากไฮโดรไลเสตใบอ้อย

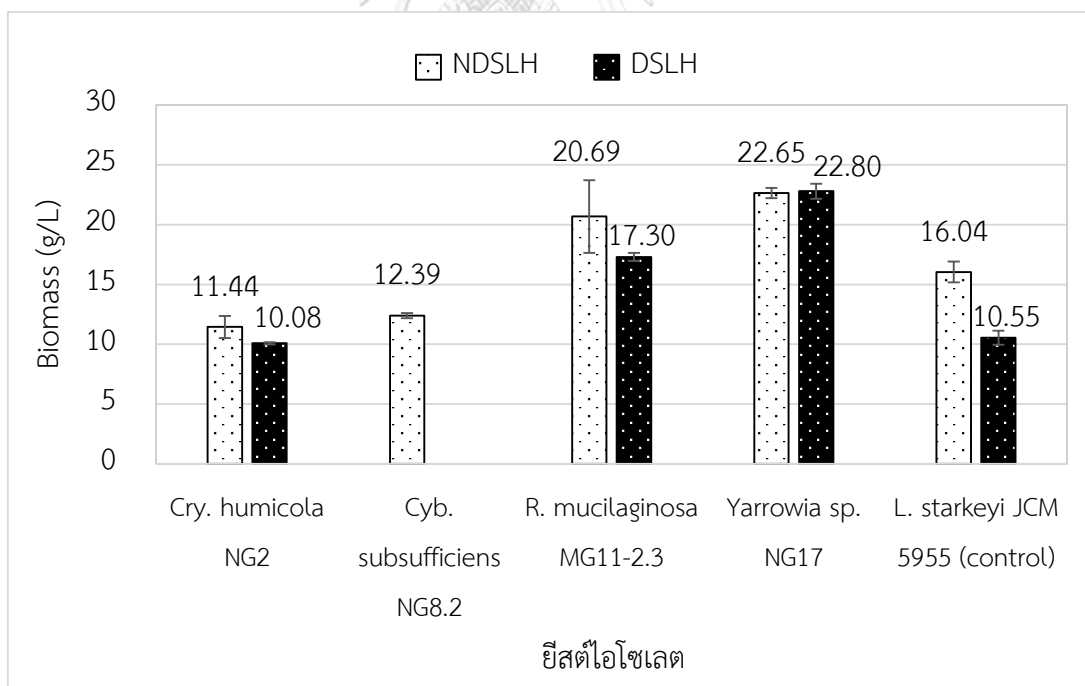
จากการเปรียบเทียบผลผลิตน้ำมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (lipid content) เมื่อเลี้ยงยีสต์โอลิจินัสที่คัดกรองได้ใน NDSLH และใน DSLH นาน 6 วัน โดยมี *L. starkeyi* JCM 5995 เป็นสายพันธุ์ควบคุม พบว่า *Cry. humicola* NG2 ผลิตน้ำมันสูงสุดในอาหารทั้ง 2 ชนิด คือ NDSLH และ DSLH ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้จาก *L. starkeyi* JCM 5995 รองลงมาคือ *Yarrowia* NG17, *R. mucilaginosa* MG11-2.3 และ *Cyb. subsufficiens* NG8.2 ตามลำดับ ทุกชุดการทดลองยีสต์ที่เลี้ยงใน NDSLH มีปริมาณน้ำมันสูงกว่าที่เลี้ยงใน DSLH (รูปที่ 4 - 10) และเมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ (biomass) ซึ่งได้จากการทำเซลล์ให้แห้งด้วยสุญญากาศ พบว่า *Yarrowia* NG17 มีปริมาณเซลล์สูงที่สุดและมีปริมาณใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่ยีสต์ชนิดอื่นและ *L. starkeyi* JCM 5995 ที่เลี้ยงใน NDSLH มีปริมาณเซลล์สูงกว่าที่เลี้ยงใน DSLH โดย *R. mucilaginosa* MG11-2.3 มีปริมาณเซลล์สูงที่สุด รองลงมาคือ *Cyb. subsufficiens* NG8.2 และ *Cryptococcus humicola* NG2 ตามลำดับ (รูปที่ 4 - 11) *Yarrowia* NG17 มีปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้ต่ออาหาร 1 ลิตร (lipid yield) สูงที่สุดทั้งในอาหาร NDSLH และ DSLH เท่ากับ 2.30 กรัม/ลิตร และ 2.10 กรัม/

ลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือ *R. mucilaginos* MG11-2.3 และ *Cry. humicola* NG2 (เท่ากับ 1.85 และ 1.64 กรัม/ลิตร) ตามลำดับ (รูปที่ 4 - 12) เนื่องจาก *Cyb. subsufficiens* NG8.2 ผลิตน้ำมันได้น้อยที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร DSLH เท่ากับ 0.36 กรัม/ลิตร จึงไม่เหมาะสำหรับการนำไปผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตไบโอย์จึงไม่ทดสอบต่อในอาหาร NDSLH นอกจากนี้ *Yarrowia* NG17 สามารถผลิตน้ำมันได้มากกว่า *L. starkeyi* JCM 5995 จากผลการทดลองจึงเลือก *Yarrowia* NG17 ไปศึกษาต่อเนื่องจากให้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงใน NDSLH

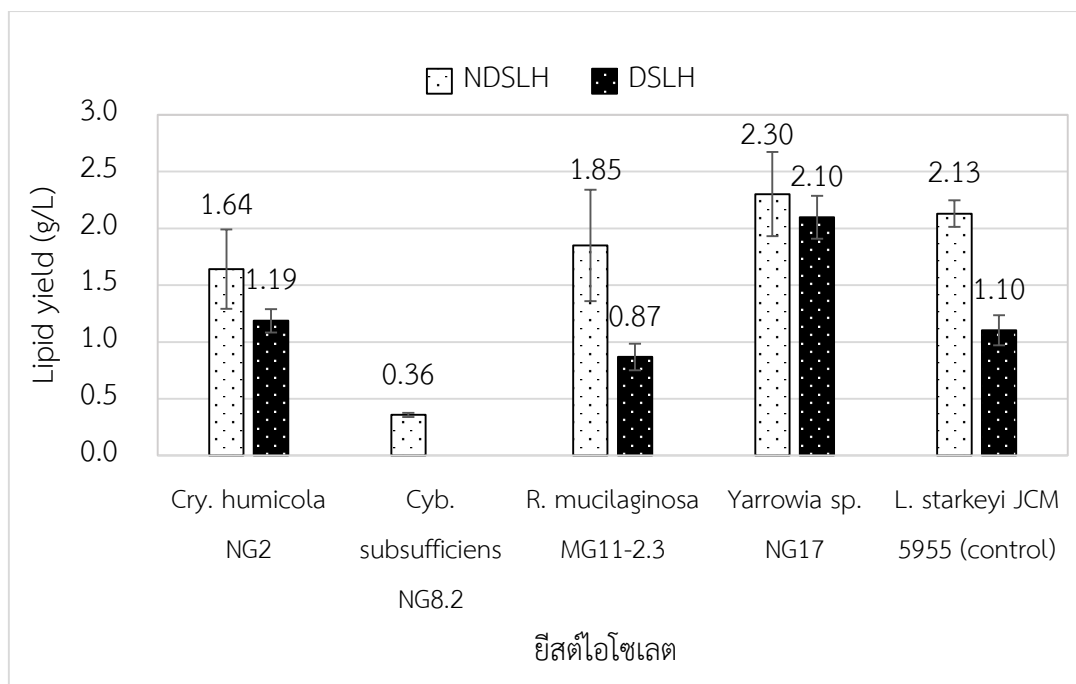
จากการวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ในไฮโดรไลเสตไบโอย์ (ตารางที่ 4 - 10) NDSLH และ DSLH มีปริมาณเฟอร์ฟูรัล 0.13 กรัม/ลิตร และ 0.10 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล 0.30 กรัม/ลิตร และ 0.29 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองยีสต์ทุกสายพันธุ์ผลิตน้ำมันได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงใน NDSLH ซึ่งสอดคล้องกับ Yu และคณะ (2011) ที่รายงานว่า *Cry. curvatus* (ATCC 20509), *L. starkeyi* (ATCC 12659), *R. glutinis* (ATCC 204091) และ *Y. lipolytica* (ATCC 20460) มีปริมาณเซลล์และปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ลดลงเมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตฟางข้าวที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์เช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากการกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ด้วยวิธีปรับต่างเกินทำให้ปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสตไบโอย์ลดลง ยีสต์จึงผลิตน้ำมันและมีปริมาณเซลล์ได้น้อยลงตามไปด้วย ยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถทนต่อปริมาณสารยับยั้งการเจริญได้ต่างกัน Yu และคณะ (2014) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Cry. curvatus* ATCC 20509 ในอาหารที่เติมเฟอร์ฟูรัล 0.1 กรัม/ลิตร จะผลิตน้ำมันและมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ไม่เติมเฟอร์ฟูรัล) แต่ถ้าหากมีเฟอร์ฟูรัลเข้มข้นมากกว่า 1.0 กรัม/ลิตร จะทำให้ปริมาณน้ำมันและปริมาณเซลล์ลดลง 78.4% และ 61.0% ตามลำดับ Hu และคณะ (2009) รายงานว่า *Rh. toruloides* Y4 ผลิตเซลล์ลดลง 45% เมื่อมีปริมาณเฟอร์ฟูรัลเข้มข้น 0.001 กรัม/ลิตร นอกจากนี้สาเหตุของปริมาณน้ำมันและปริมาณเซลล์ที่ลดลงเมื่อเลี้ยงยีสต์ใน DSLH อาจเนื่องมาจากการปรับต่างเกินด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เพราะ Ca^{2+} อาจจับกับ PO_4^{3-} ในไฮโดรไลเสตแล้วตกตะกอน $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Wu และคณะ, 2010) ทำให้ยีสต์ขาดธาตุอาหารฟอสฟอรัสซึ่งสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ยีสต์จึงสะสมน้ำมันและเจริญใน DSLH ได้ลดลงเมื่อเทียบกับการเลี้ยงใน NDSLH แต่อย่างไรก็ตาม Huang และคณะ (2009) รายงานว่า *T. fermentans* สามารถผลิตน้ำมันได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตฟางข้าวที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ จากผลการทดลองสรุปได้ว่ายีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถทนต่อสารยับยั้งการเจริญที่พบในไฮโดรไลเสตของวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสได้แตกต่างกัน ในการผลิตน้ำมันจึงควรใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ทนต่อสารยับยั้งการเจริญเหล่านี้ได้ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตที่มาจากกระบวนการกำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ในไฮโดรไลเสต



รูปที่ 4 - 10 ปริมาณน้ำมัน (lipid content) ที่ยีสต์ผลิตเมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ไม่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (NDSLH) และในไฮโดรไลเสตที่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (DSLH)



รูปที่ 4 - 11 ปริมาณเซลล์ (biomass) ยีสต์ผลิตเมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ไม่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (NDSLH) และในไฮโดรไลเสตที่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (DSLH)



รูปที่ 4 - 12 ผลผลิตน้ำมัน (lipid yield) ยีสต์ผลิตเมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ไม่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (NDSLH) และในไฮโดรไลเสตที่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (DSLH)

4.8 ผลการหาภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์ *Yarrowia* NG17 จากไฮโดรไลเสตไบอ้อย

4.8.1 ผลของการเติม แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) หรือแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) ลงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยต่อการผลิตน้ำมันของ *Yarrowia* NG17

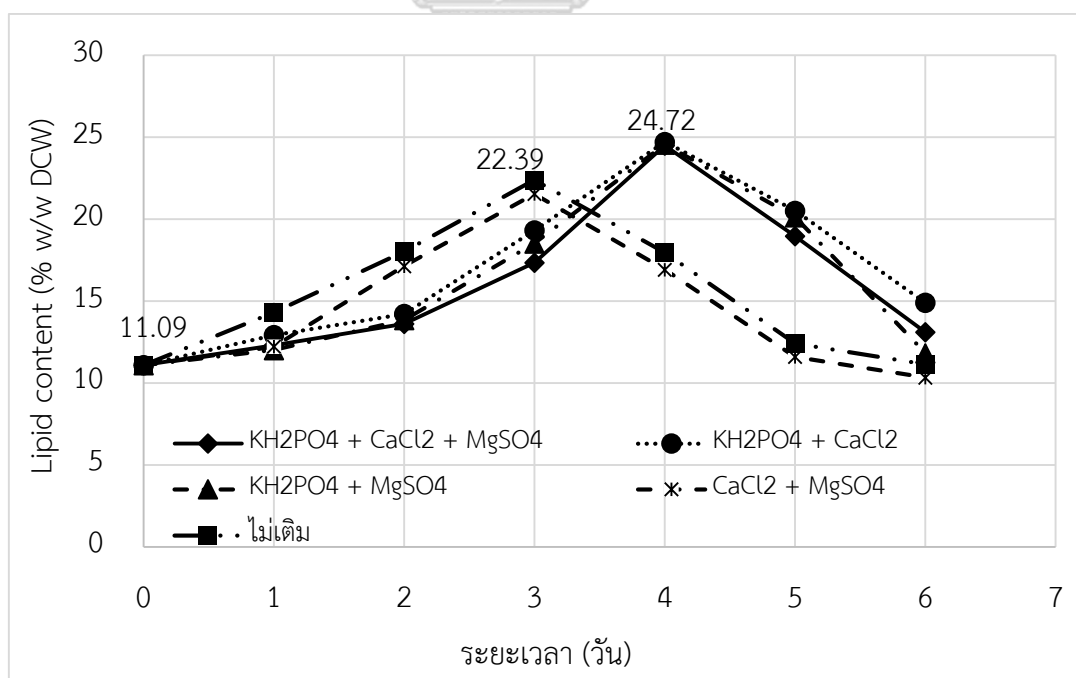
ผลการเลี้ยง *Yarrowia* NG17 ใน NDSLH ซึ่งเติม 0.1% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.001% แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) หรือ 0.005% แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกัน 3 ชนิด หรือ 2 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าให้อากาศที่ 200 รอบ/นาที นาน 6 วัน ใช้ NDSLH ซึ่งไม่เติมสารใดๆ เป็นชุดควบคุมพบว่า *Yarrowia* NG17 ที่เจริญใน NDSLH ที่ไม่เติมสารใด และใน NDSLH ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟต ผลิตและสะสมน้ำมันสูงสุดที่วันที่ 3 เท่ากับ 22.39% และ 21.54% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ แต่ *Yarrowia* NG17 ที่เจริญใน NDSLH ที่เติม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟต, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแคลเซียมคลอไรด์ หรือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต ผลิตและสะสมน้ำมันสูงสุดวันที่ 4 เท่ากับ 24.51% 24.72% และ 24.56% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4 - 13) การเจริญของ *Yarrowia* NG17 ใกล้เคียงกันในทุกการทดลอง (รูปที่ 4 - 14) จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็น

ว่าการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในไฮโดรไลเสตไปอ้อยทำให้ *Yarrowia* NG17 ผลิตและสะสมน้ำมันในเซลล์สูงขึ้น *Yarrowia* NG17 ที่เลี้ยงใน NDSLH ที่ไม่เติมสารใดๆเป็นเวลา 3 วัน สะสมน้ำมันภายในเซลล์ 22.39% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำมันที่ผลิตเท่ากับ lipid yield 4.56 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงใน NDSLH ซึ่งเติม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแคลเซียมคลอไรด์ เป็นเวลา 4 วัน สะสมน้ำมันภายในเซลล์ 24.72% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำมันที่ผลิตเท่ากับ lipid yield 5.88 กรัม/ลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการผลิตและสะสมน้ำมันจะพบว่า *Yarrowia* NG17 มีอัตราการผลิตและสะสมน้ำมันในเซลล์เมื่อเลี้ยงใน NDSLH ที่ไม่เติมสารใดๆ (1.52 กรัม/ลิตร/วัน) ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงใน NDSLH ที่เติม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแคลเซียมคลอไรด์ จึงเลือกใช้ NDSLH ที่ไม่เติมสารใดในการทดลองต่อไป

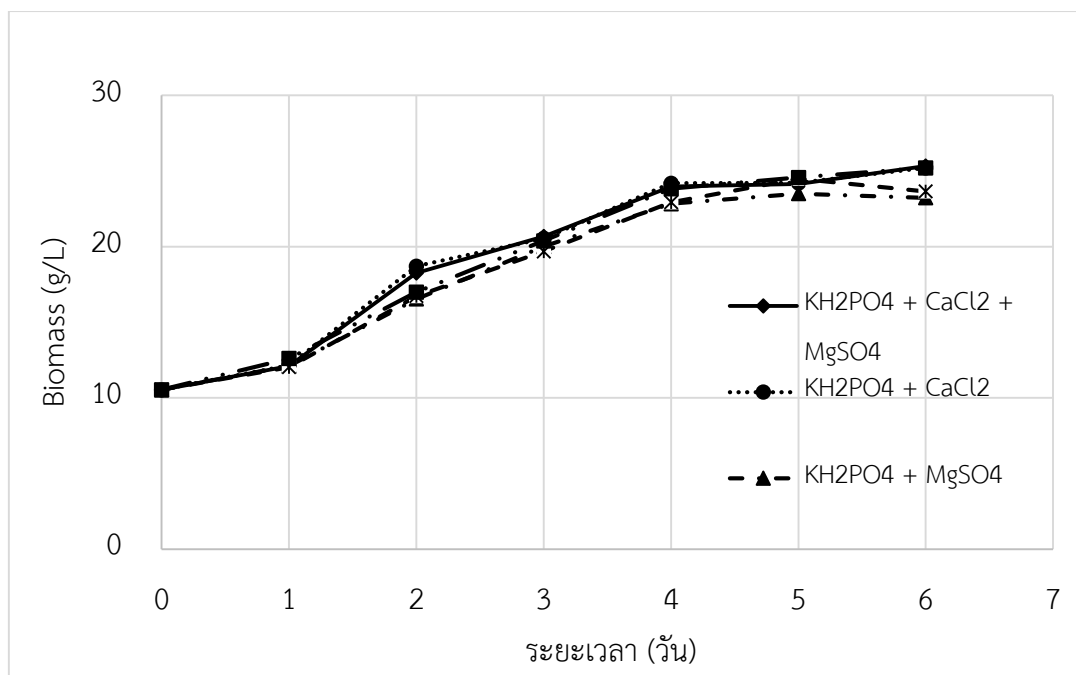
โดยทั่วไปการหาภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์นิยมใช้การแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอน : ไนโตรเจน (C/N) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ควบคุมยากในไฮโดรไลเสตของวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ประสิทธิภาพการย่อยลิกโนเซลลูโลส ชนิดของพืชที่ใช้ ปริมาณของสัดส่วนเซลลูโลสต่อเฮมิเซลลูโลสต่อลิกนิน และปริมาณเอนไซม์ (แหล่งไนโตรเจน) ที่เติมลงไปในการย่อย (Jin และคณะ, 2015) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำมันของยีสต์จึงนิยมใช้วิธีการเติมสารอาหาร (trace element) ที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตน้ำมันของยีสต์ เช่น CaCl_2 , KH_2PO_4 และ MgSO_4 (Wu และคณะ, 2010; Wang และคณะ, 2012; Chen และคณะ, 2013; Bhatia และคณะ, 2017) เป็นต้น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และ แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์น้ำมันโดยมีบทบาทเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ให้เอนไซม์ เช่น acetyl-CoA carboxylase, malic enzyme เป็นต้น เพื่อสังเคราะห์ malonyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) สำหรับการสังเคราะห์ไขมัน (Scorpio และ Masoro, 1970) นอกจากนี้ Ca^{2+} ยังมีบทบาทสำคัญต่อเซลล์ในการทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณ (signal transduction) ทำให้เกิดการตอบสนองต่อการสังเคราะห์ไขมันเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะขาดไนโตรเจน (nitrogen starvation) (Chen และคณะ, 2014) Hamid และคณะ (1995) รายงานว่าแคลเซียมคลอไรด์มีผลยับยั้งยีสต์การผลิตน้ำมันของยีสต์ *L. lipofer* แต่จากรายงานของ Gorain และคณะ (2013) พบว่าสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* จะผลิตน้ำมันมากขึ้นจาก 11.3% เป็น 20.0% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0.001% เป็น 0.002% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) มีบทบาทสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพราะนอกจากจะเป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกในนิวคลีโอไทด์และฟอสโฟลิพิดในผนังเซลล์แล้ว ฟอสเฟตยังมีความสำคัญกับกระบวนการต่างๆ ของเซลล์เนื่องจากใช้ในการสังเคราะห์ Adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ และ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

(NADPH) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน (Ratlidge และ Wynn, 2002) เป็นต้น Wu และคณะ (2010) รายงานว่า *Rh. toruloides* Y4 ผลิตน้ำมันมากขึ้นเป็น 62.2% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อแปรผันอัตราส่วนของคาร์บอน : ฟอสฟอรัส เท่ากับ 9952 ในอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอน : ไนโตรเจน เท่ากับ 6.1 เมื่อฟอสฟอรัสถูกใช้หมดไปยีสต์จะเริ่มสะสมน้ำมันซึ่งคาดว่าฟอสฟอรัสมีบทบาทในการเหนี่ยวนำการสะสมน้ำมันของยีสต์เช่นเดียวกับกับไนโตรเจน การแปรผันปริมาณฟอสฟอรัสจึงอาจเป็นประโยชน์ต่อการผลิตน้ำมันยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี C/N สูง Gorain และคณะ (2013) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจาก 0.005 % เป็น 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำให้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นจาก 11.9% เป็น 27.1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ Chen และคณะ (2013) รายงานว่าเมื่อเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.03% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงในไฮโดรไลเสตซังข้าวโพดจะทำให้ *T. cutaneum* CH002 ผลิตน้ำมันได้มากที่สุดเท่ากับ 40% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ถ้าหากเติมมากเกินไปกลับส่งผลให้ผลิตน้ำมันน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ที่พบว่าการเติมฟอสเฟตปริมาณ 0.1% น้ำหนัก/ปริมาตร ส่งผลให้ *Yarrowia* NG17 ผลิตน้ำมันลดลง อาจเนื่องมาจากความไม่เหมาะสมของอัตราส่วนคาร์บอน : ฟอสฟอรัส ในไฮโดรไลเสตใบอ้อย จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยแปรผันปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต



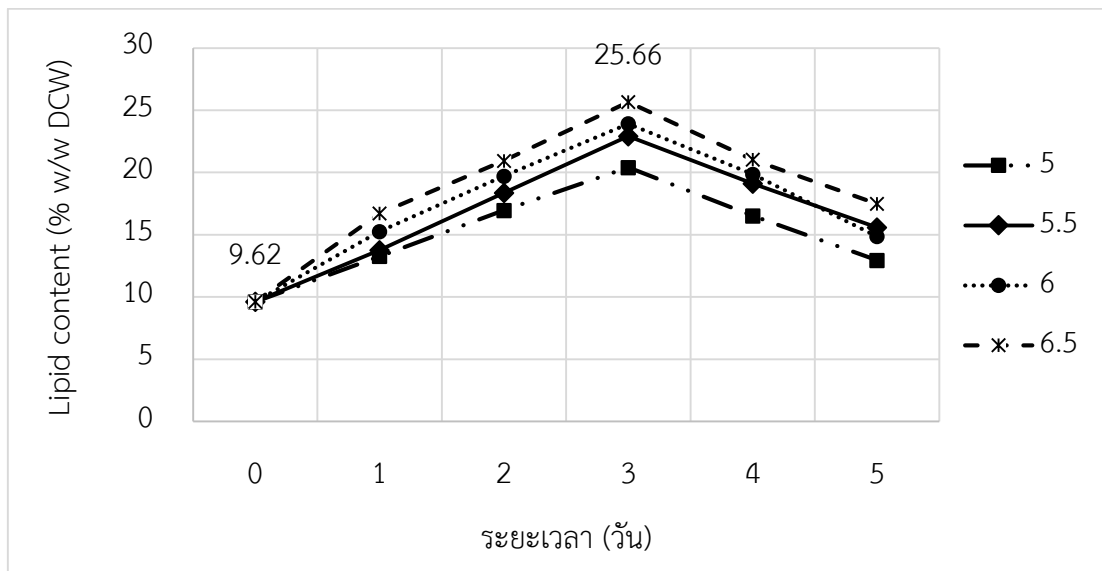
รูปที่ 4 - 13 ผลของการเติม KH₂PO₄, CaCl₂ หรือ MgSO₄ รวมกัน 3 ชนิด หรือ 2 ชนิด ลงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยต่อการผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของ *Yarrowia* NG17



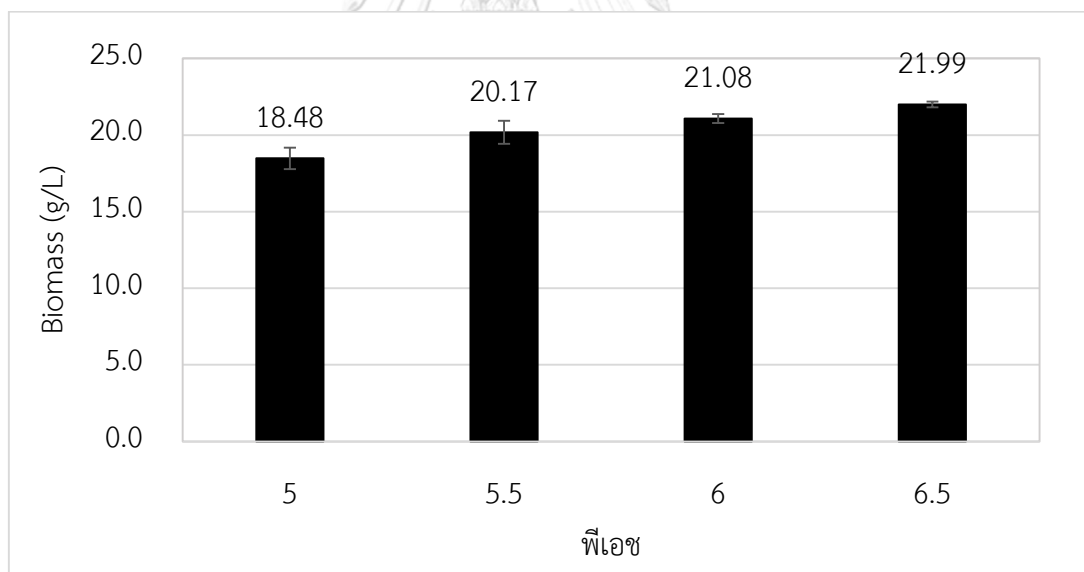
รูปที่ 4 - 14 ผลของการเติม KH₂PO₄, CaCl₂ หรือ MgSO₄ รวมกัน 3 ชนิด หรือ 2 ชนิด ลงในไฮโดรไลเซตใบอ้อยต่อการเจริญของ *Yarrowia* NG17

4.8.2 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 ในไฮโดรไลเซตใบอ้อย

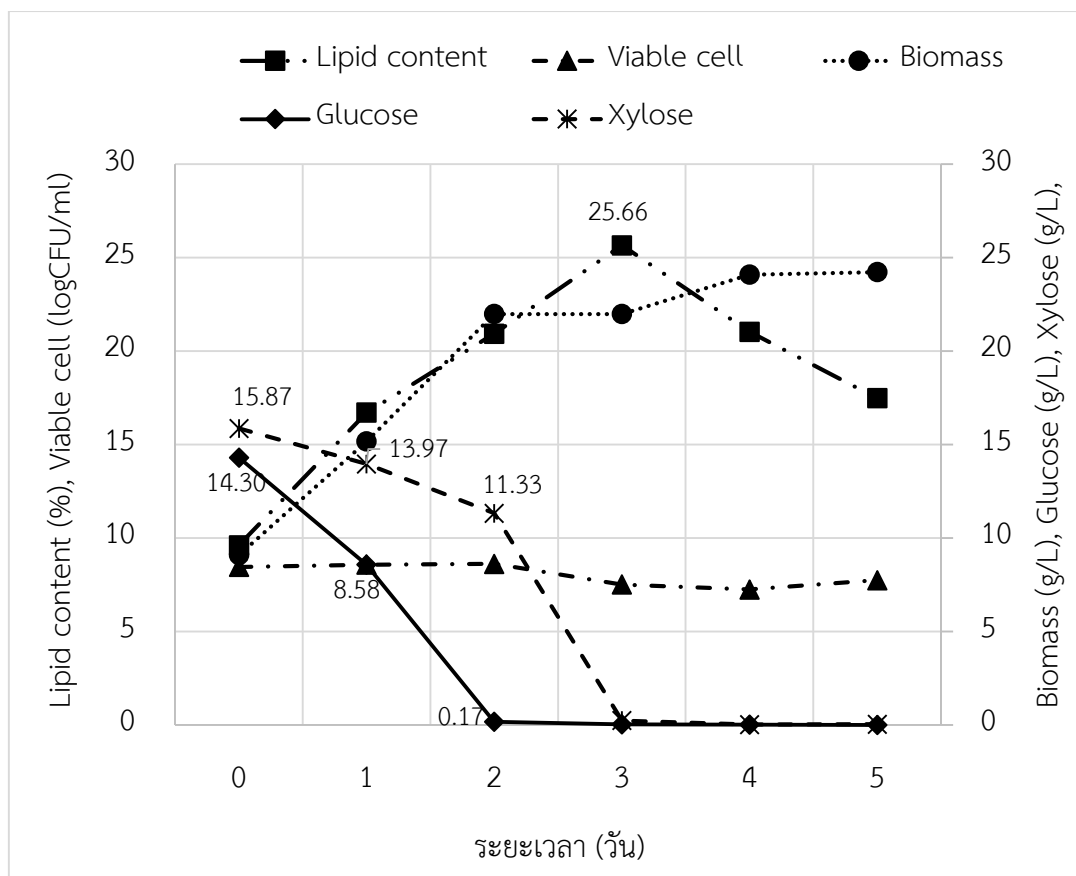
เมื่อเลี้ยง *Yarrowia* NG17 ในไฮโดรไลเซตใบอ้อยที่แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 (รูปที่ 4 - 15) พบว่า *Yarrowia* NG17 ผลิตน้ำมันสูงสุดที่วันที่ 3 ในทุกๆ ค่าพีเอช โดยสะสมน้ำมันสูงสุด 25.66% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเซตใบอ้อยที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 ไฮโดรไลเซตใบอ้อยที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า ปริมาณน้ำมันที่สะสมได้จะน้อยลงด้วย เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ (รูปที่ 4 - 16) พบว่า *Yarrowia* NG17 เจริญในไฮโดรไลเซตใบอ้อยที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 21.99 กรัม/ลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้เท่ากับ lipid yield 5.64 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงที่สุดเท่ากับ เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาสร้างกราฟเพื่อดูรูปแบบการผลิตน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 ในไฮโดรไลเซตใบอ้อยที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 (รูปที่ 4 - 17) พบว่า *Yarrowia* NG17 สะสมน้ำมันไปพร้อมกับการเจริญ (growth-associated) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 14.30 กรัม/ลิตร หมดในวันที่ 2 จากนั้นจึงใช้น้ำตาลไซโลสซึ่งในวันที่ 2 มีน้ำตาลไซโลสเหลือ 11.33 กรัม/ลิตร และใช้หมดในวันที่ 3 ซึ่งเป็นวันที่ยีสต์สะสมน้ำมันภายในเซลล์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 25.66% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ภายหลังจากวันที่ 3 ปริมาณน้ำมันเริ่มลดลง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) มีจำนวนคงที่เนื่องจากยีสต์สะสมน้ำมันภายในเซลล์จึงทำให้น้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเซลล์ (biomass) และปริมาณน้ำมันที่เพิ่มขึ้นด้วย



รูปที่ 4 - 15 ปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์ของ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่างๆ



รูปที่ 4 - 16 ปริมาณเซลล์ของ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่างๆ



รูปที่ 4 - 17 รูปแบบการผลิตน้ำมันของ *Yarrowia sp. NG17* เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5

จากผลการทดลองพบว่า *Yarrowia NG17* มีรูปแบบการใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสเพื่อการผลิตน้ำมันแบบใช้พร้อมกัน ซึ่งใช้กลูโคสถูกเร็วกว่าเพราะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้ง่ายกว่า Patel และคณะ (2015) รายงานว่า *Rh. kratochvilovae* HIMPA1 มีรูปแบบการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโทส และน้ำตาลซูโครสเพื่อการผลิตน้ำมันแบบใช้พร้อมกัน แต่สามารถใช้กลูโคสได้ในอัตราที่สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นใน 48 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง Yang และคณะ (2014) รายงานว่า *L. starkeyi* AS 2.1560 ใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแมนโนสพร้อมกันซึ่งสะสมน้ำมันในเซลล์ได้ 30.8% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

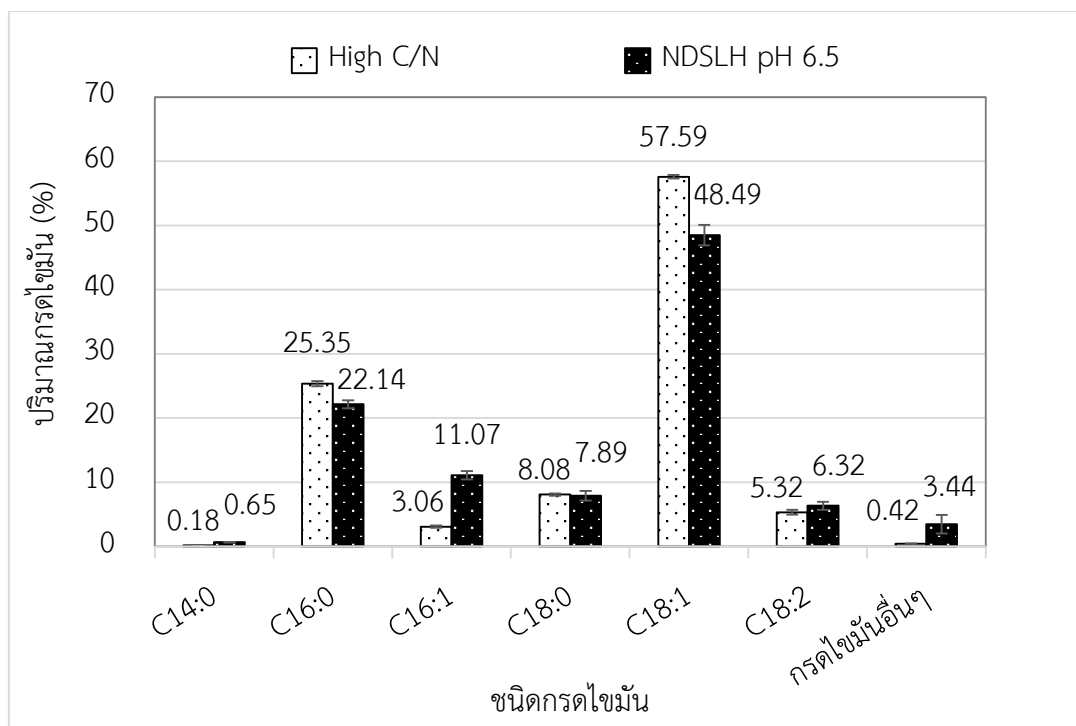
ยีสต์ *Y. lipolytica* เป็นยีสต์โอลิจินัสที่นิยมศึกษาเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาว่าปลอดภัย (Generally recognized as safe; GRAS) (Groenewald และคณะ, 2014) Tsigie และคณะ (2011) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Y. lipolytica* Po1g ในไฮโดรไลเสตขานอ้อยที่เตรียมโดยการปรับสภาพขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สามารถผลิตน้ำมันและเซลล์ได้ปริมาณ 58.5% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

และ 11.42 กรัม/ลิตร ตามลำดับ Yu และคณะ (2011) รายงานว่า *Y. lipolytica* ATCC 20460 ผลิตน้ำมันและเซลล์ได้ปริมาณ 4.6% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 7.8 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตฟางข้าวที่เตรียมจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ *Y. lipolytica* YB-420 สามารถผลิตน้ำมันและเซลล์ได้ปริมาณ 37.9% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 13.4 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตหญ้าสวิตซ์ที่เตรียมจากการปรับสภาพหญ้าสวิตซ์ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.936% (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส นอกจากนี้ *Y. bubula* Y-63668, *Y. divulgata* Y-63741, *Y. deformans* Y-321, *Y. keelungensis* Y-63742 และ *Y. porcina* Y-63669 ผลิตน้ำมันได้ 9.2%, 9.3%, 10.7%, 15.6% และ 11.6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (Quarterman และคณะ, 2017) จากผลการทดลอง *Yarrowia* NG17 (25.66%) สะสมน้ำมันได้น้อยกว่า *Y. lipolytica* Po1g (58.5%) แต่มีปริมาณเซลล์มากกว่าประมาณสองเท่า ซึ่งคิดเป็นผลผลิตน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 เท่ากับ 5.64 กรัม/ลิตร ซึ่งน้อยกว่าผลผลิตน้ำมันของ *Y. lipolytica* Po1g (6.68 กรัม/ลิตร)

4.9 ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมัน *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5

ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันยีสต์ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตใบอ้อยที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 (รูปที่ 4-18) พบว่ามีกรดโอเลอิก (C18:1) และกรดปาล์มิติก (C16:0) เป็นองค์ประกอบหลักที่ปริมาณ 48.49% และ 22.14% ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารต่างชนิดกัน (รูปที่ 4 - 18) คือ อาหาร High C/N (จากข้อ 4.4) และไฮโดรไลเสตใบอ้อยพีเอชเริ่มต้น 6.5 พบว่าองค์ประกอบของน้ำมันมีความแตกต่างกันคือ น้ำมันที่ผลิตได้จากไฮโดรไลเสตใบอ้อยมีสัดส่วนของกรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติกลดลง 15.80% และ 12.66% ตามลำดับ แต่มีปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1) เพิ่มขึ้น 3.62 เท่า ซึ่งกรดปาล์มิโตเลอิกเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 พันธะ (monounsaturated fatty acid) กรดไขมันชนิดนี้เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์และเนื้อเยื่อไขมันในร่างกายมนุษย์ (human adipose tissue) พบปริมาณมากในน้ำมันถั่วแมคคาเดเมียและผลซีบัคธอร์น (sea buckthorn) ซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นของประเทศออสเตรเลีย มีกรดปาล์มิโตเลอิกเป็นองค์ประกอบในน้ำมันสูงถึง 20% ของกรดไขมันทั้งหมด (Kolouchova และคณะ, 2015) กรดปาล์มิโตเลอิกมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคเบาหวานเพราะช่วยลดปริมาณไขมันความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL) ลดปริมาณคอเลสเตอรอล และลดการเกิดอะพอโพโทซิสของเซลล์ตับ

(apoptosis) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคเบาหวาน (Griel และคณะ, 2008; Morgan และ Dhayal, 2010) นอกจากนี้กรดพาล์มิโตเลอิกยังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบของผิวหนัง (anti-inflammatory) และช่วยรักษาผิวหนังที่โดนความร้อนและรังสีได้อีกด้วย (Gao และคณะ, 2003) จึงอาจเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการใช้ประโยชน์จากน้ำมันยีสต์ *Yarrowia* NG17 ที่ผลิตจากไฮโดรเสตไบออย



รูปที่ 4 - 18 เปรียบเทียบชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบออยที่มีพีเอช 6.5 และอาหาร High C/N

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Yu และคณะ (2011) รายงานกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมัน *Y. lipolytica* Po1g เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตฟางข้าวที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พบว่าประกอบด้วยกรดโอเลอิก 55.55% กรดพาล์มิติก 17.76% และกรดพาล์มิโตเลอิก 14.12% ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งใกล้เคียงกับองค์ประกอบน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 นอกจากนี้ชนิดและสัดส่วนของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันยีสต์โอลิจินัสขึ้นอยู่กับองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ชนิดของแหล่งคาร์บอน และสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่มีอยู่ในไฮโดรไลเสต เป็นต้น น้ำมันของยีสต์ *R. kratochvilovae* HIMPA1 ที่เลี้ยงในสารละลายกลูโคสเข้มข้น 4% น้ำหนัก/ปริมาตร มีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ กรดโอเลอิก กรดสเตียริก และกรดพาล์มิติก เท่ากับ 21.95% 20.71% และ 17.56% ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ แต่น้ำมันที่ผลิตได้เมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากฝักของต้นราชพลุกษ์ (กลูโคส 2.9% ฟรักโทส 1.8% และไซโลส 0.4% น้ำหนัก/ปริมาตร) มีสัดส่วนของกรดพาล์มิติก

มิติกและกรดสเตียริกเพิ่มขึ้นเท่ากับ 43.06% และ 28.74% ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ แต่สัดส่วนของกรดโอเลอิกลดลงเหลือ 17.34% ของกรดไขมันทั้งหมด (Patel และคณะ, 2015) Poontawee และคณะ (2017) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Rh. paludigenum* DMKU-RE61 ในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน น้ำมันที่ผลิตได้จะมีสัดส่วนของกรดโอเลอิกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้เฟอร์ฟูรัลยังส่งผลทำให้สัดส่วนของกรดโอเลอิกในน้ำมันลดลงด้วย สอดคล้องกับสัดส่วนของกรดโอเลอิกที่ลดลงในน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอัสที่มีเฟอร์ฟูรัล ปริมาณ 0.13 กรัม/ลิตร อย่างไรก็ตามชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันยีสต์ *Yarrowia* NG17 มีความใกล้เคียงกับน้ำมันเมล็ดแรมซึ่งเป็นน้ำมันพืชที่นิยมนำมาผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด (Atabani และคณะ, 2012) เพราะมีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันคือ กรดโอเลอิก ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 55-65% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด กรดโอเลอิก มีชื่อทางเคมีว่า octadecenoic acid เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม มีพันธะคู่ (double bond) 1 พันธะ ด้วยโครงสร้างทางเคมีของกรดโอเลอิกทำให้น้ำมันดีเซลที่ผลิตได้มีค่าพารามิเตอร์เหมาะสมสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล เช่น เลขซีเทน (cetane number) จุดหลอมเหลว (melting point) ความคงตัวต่อออกซิเดชัน (oxidative stability) ความหนืด (kinematic viscosity) และอุณหภูมิการเผาไหม้ (heat of combustion) (Knothe, 2005) เป็นต้น ซึ่งน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 ที่เลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอัสมีกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลักจึงเหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันดีเซล

Soccol และคณะ (2017) รายงานการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันของ *Rh. toruloides* DEBB 5533 โดยเลี้ยงแบบการหมักแบบเติม (fed-batch) ในถังหมักขนาด 1,500 ลิตร (ปริมาณการทำงาน 1,000 ลิตร) โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตน้ำมันได้ 0.44 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง มีกรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันของ *Rh. toruloides* DEBB 5533 และมีปริมาณผลผลิตน้ำมันมากกว่าถั่วเหลืองถึง 6 เท่า เมื่อนำไปผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซลพบว่าการเผาไหม้ของน้ำมันไบโอดีเซลที่ได้ปลดปล่อยมลพิษลดลง คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ออกไซด์ของไนโตรเจน (NO_x) และไฮโดรคาร์บอน (HC) เมื่อเทียบกับน้ำมันไบโอดีเซลที่เตรียมจากน้ำมันถั่วเหลือง และเมื่อคำนวณต้นทุนการผลิตที่มาจาก ราคาวัตถุดิบทั้งหมดและค่าไฟ พบว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันของ *Rh. toruloides* DEBB 5533 มีราคาต่ำกว่าน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืช จากผลการทดลอง *Yarrowia* NG17 มีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ กรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติกเช่นกัน จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปผลิตไบโอดีเซล แต่ *Yarrowia* NG17 สามารถผลิตน้ำมันได้เพียง 0.078 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง จึงควรเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำมันซึ่งอาจทำได้โดยการแปรผันปัจจัยอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น แปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อ

ฟอสฟอรัส และอายุของกล้าเชื้อ เป็นต้น จากผลการทดลอง *Yarrowia* NG17 สามารถผลิตน้ำมันได้ สูงที่สุดเมื่อใช้น้ำตาลทั้งหมด หลังจากนั้นปริมาณน้ำมันจึงค่อยๆลดลง ดังนั้นการเลี้ยงเซลล์แบบการ หมักแบบเติม ซึ่งเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนอาจช่วยให้เซลล์สามารถผลิตน้ำมันต่อไปได้



บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

5.1. คัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลต แบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 จำนวน 29 ไอโซเลต ยีสต์ที่แยกได้จากสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 จำนวน 58 ไอโซเลต และยีสต์ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาวจำนวน 19 ไอโซเลต

5.2. การจัดจำแนกชนิดยีสต์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของยีน LSU rDNA พบว่าจัดอยู่ใน 15 จีนัส 25 สปีชีส์ คือ *Candida akabanensis* (3 สายพันธุ์) *C. carpophila* (1 สายพันธุ์) *C. edaphicus* (2 สายพันธุ์) *C. glabrata* (6 สายพันธุ์) *C. orthopsilosis* (6 สายพันธุ์) *C. pseudolambica* (2 สายพันธุ์) *C. sanitii* (1 สายพันธุ์) *C. silvae* (1 สายพันธุ์) *C. thaimueangensis* (1 สายพันธุ์) *C. tropicalis* (11 สายพันธุ์) *Cryptococcus humicola* (1 สายพันธุ์) *Cry. laurentii* (1 สายพันธุ์) *Cyberlindnera subsufficiens* (1 สายพันธุ์) *Hanseniaspora thailandica* (1 สายพันธุ์) *Kluyveromyces aestuarii* (26 สายพันธุ์) *Kodamaea ohmeri* (1 สายพันธุ์) *Lachancea thermotolerans* (1 สายพันธุ์) *Meyerozyma caribbica* (5 สายพันธุ์) *Nakazawaea siamensis* (1 สายพันธุ์) *Pichia kudriavzevii* (4 สายพันธุ์) *Saccharomycopsis fermentans* (1 สายพันธุ์) *Schwanniomyces vanrijae* (10 สายพันธุ์) *Trichosporon mycotoxinivorans* (2 สายพันธุ์) และ *Wickerhamomyces sydowiorum* (3 สายพันธุ์) ซึ่งพบสปีชีส์ *K. aestuarii* มากที่สุดจากสถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 และสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 11 และพบสปีชีส์ *C. akabanensis* มากที่สุดจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกหงาว นอกจากนั้นยังพบยีสต์ที่อาจเป็นสปีชีส์ใหม่จำนวน 4 สปีชีส์ คือ *Candida* sp. (1 สปีชีส์) *Kurtzmaniella* sp. (1 สปีชีส์) *Wickerhamomyces* sp. (1 สปีชีส์) และ *Yarrowia* sp. (1 สปีชีส์)

5.3. คัดกรองยีสต์สะสมน้ำมันภายในเซลล์มากกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่เซลล์ด้วยวิธีย้อมสีไนล์เรดได้ 24 สายพันธุ์ คือ *C. orthopsilosis* MG11-11.3, *C. tropicalis* จำนวน 8 สายพันธุ์ (MG1-8, MG11-4.1, MG11-8.2, MG11-17.3, MG11-4w.2, MG11-20w.2, MG11-20w.4 และ NG21), *Cyb. subsufficiens* NG8.2, *Cry. humicola* NG2, *Cry. laurentii* NG22, *K. aestuarii* จำนวน 4 สายพันธุ์ (MG1-1, MG1-7, MG1-12.2 และ MG1-8w.3), *Kurtzmaniella* จำนวน 3 สายพันธุ์ (NG4.3, NG5, และ NG6), *Lac. thermotolerans* MG11-17.2, *R. mucilaginosa* MG11-2.3, *T. mycotoxinivorans* จำนวน 2 สายพันธุ์ (MG11-12.3 และ NG4.1) และ *Yarrowia* NG17

5.4. คัดกรองยีสต์จากข้อ 5.3 ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญได้ 16 สายพันธุ์ คือ *C. orthopsilosis* MG11-11.3, *C. tropicalis* จำนวน 8 สายพันธุ์ (MG1-8, MG11-4.1, MG11-8.2, MG11-17.3, MG11-4w.2, MG11-20w.2, MG11-20w.4 และ NG21), *Cyb. subsufficiens* NG8.2, *Cry. humicola* NG2, *Cry. laurentii* NG22, *R. mucilaginosa* MG11-2.3, *T. mycotoxinivorans* จำนวน 2 สายพันธุ์ (MG11-12.3 และ NG4.1) และ *Yarrowia* NG17

5.5 ยีสต์จากข้อ 5.4 มีคุณสมบัติเป็นยีสต์โอลิจินัสจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Cry. humicola* NG2, *T. mycotoxinivorans* MG11-12.3, *Cyb. subsufficiens* NG8.2, *R. mucilaginosa* MG11-2.3 และ *Yarrowia* NG17 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวไนโตรเจนต่ำ ซึ่ง *Yarrowia* NG17 ผลิตน้ำมันได้สูงสุดเท่ากับ 27.93% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือคิดเป็น 5.07 กรัม/ลิตร

5.6 เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานว่า *Cyb. subsufficiens* และ *T. mycotoxinivorans* เป็นยีสต์โอลิจินัส แต่ไม่นำ *T. mycotoxinivorans* MG11-12.3 มาศึกษาต่อเนื่องจากเป็นยีสต์ก่อโรค

5.7 น้ำมันของ *Yarrowia* NG17 มีองค์ประกอบหลักเป็นกรดไขมัน 2 ชนิด คือ กรดโอเลอิก (C18:1) กรดปาล์มติก (C16:0) เท่ากับ 57.59% และ 25.35% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ยีสต์โอลิจินัสอื่นจากข้อ 5.5 มีองค์ประกอบหลักเป็นกรดโอเลอิกและกรดปาล์มติกเช่นเดียวกัน แต่มีความแตกต่างคือ มีกรดลิโนเลอิก (C18:2) เป็นองค์ประกอบหลักด้วย นอกจากนี้ น้ำมันของ *Cry. humicola* NG2 และ *Cyb. subsufficiens* NG8.2 มีกรดสเตียริก (C18:0) และกรดปาล์มไมโตเลอิก (C16:1) เป็นองค์ประกอบหลักเพิ่มอีก 1 ชนิด ตามลำดับ

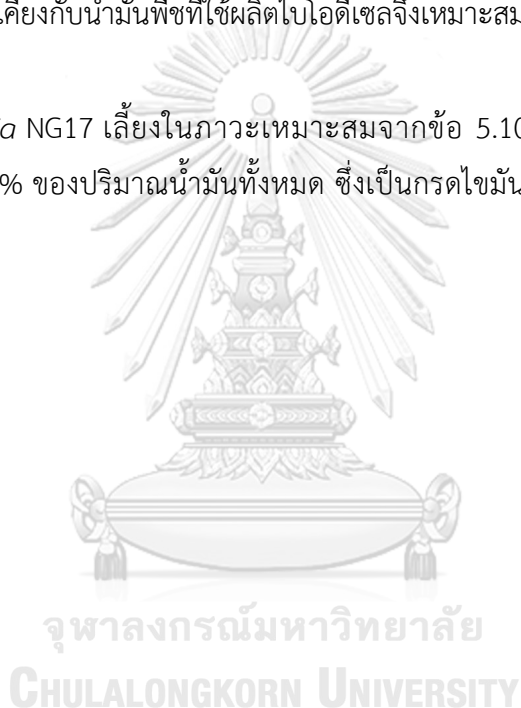
5.8 ไฮโดรไลสเสตไบอ้อยที่เตรียมได้มีองค์ประกอบคือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 18.7 กรัม/ลิตร และ 19.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.6 กรัม/ลิตร ปริมาณเฟอร์ฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural) เท่ากับ 0.13 กรัม/ลิตร และ 0.30 กรัม/ลิตร ตามลำดับ หลังจากปรับสภาพด้วยวิธีปรับต่างเกินพบว่าเฟอร์ฟูรัล น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส ลดลง 23.08% 3.74% และ 3.14% ตามลำดับ

5.9 *Yarrowia* NG17 ผลิตน้ำมันได้สูงที่สุดทั้งในไฮโดรไลสเสตไบอ้อยที่ไม่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (NDSLH) และในไฮโดรไลสเสตที่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (DSLH) เท่ากับ 2.30 กรัม/ลิตร และ 2.10 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็น 10.15% และ 9.22% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

5.10 *Yarrowia* NG17 ผลิตน้ำมันได้สูงที่สุดเท่ากับ 25.66% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีปริมาณเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 21.99 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็นปริมาณน้ำมัน 5.64 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสตไบอ้อยที่ไม่กำจัดสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ (NDSLH) พีเอช 6.0

5.11 น้ำมันของ *Yarrowia* NG17 ที่เลี้ยงในภาวะเหมาะสมจากข้อ 5.10 มีองค์ประกอบหลักเป็นกรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติกเท่ากับ 48.49% และ 22.14% ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ และมีกรดไขมันอื่นๆ คือ กรดปาล์มิโตเลอิก กรดสเตียริก และกรดลิโนเลอิก เท่ากับ 11.07% 7.89% และ 6.32% ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งน้ำมันของ *Yarrowia* NG17 มีชนิดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักใกล้เคียงกับน้ำมันพืชที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลจึงเหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันดีเซล

5.12 น้ำมัน *Yarrowia* NG17 เลี้ยงในภาวะเหมาะสมจากข้อ 5.10 มีปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิกเพิ่มขึ้นเท่ากับ 11.07% ของปริมาณน้ำมันทั้งหมด ซึ่งเป็นกรดไขมันราคาสูงที่มีประโยชน์ทางการแพทย์



รายการอ้างอิง

- Ageitos J. M., Vallejo J. A., Veiga-Crespo P. and Villa T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. Appl Microbiol Biotechnol 90(4): 1219-1227.
- Amaretti A., Raimondi S., Leonardi A. and Rossi M. (2012). *Candida freyschussii* an oleaginous yeast producing lipids from glycerol. Chem Eng Trans 27: 139-144.
- Anamnat S., Tolstorukov I., Kaneko Y. and Harashima S. (1998). Fatty acid desaturation in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* strain CBS 1976 and unsaturated fatty acid auxotrophic mutants. J Biosci Bioeng 85(5): 476-482.
- Andreevskaia V. D. and Zalashko M. V. (1979). Effect of salt supplements on lipid growth and synthesis by yeast cultivated on peat oxidates. Prikl Biokhim Mikrobiol 15(4): 522-527.
- Araujo F. V. and Hagler A. N. (2011). *Kluyveromyces aestuarii*, a potential environmental quality indicator yeast for mangroves in the state of rio de janeiro, brazil. Braz J Microbiol 42: 954-958.
- Arous F., Azabou S., Triantaphyllidou I.-E., Aggelis G., Jaouani A., Nasri M. and Mechichi T. (2017). Newly isolated yeasts from tunisian microhabitats: Lipid accumulation and fatty acid composition. Eng Life Sci 17(3): 226-236.
- Atabani A. E., Silitonga A. S., Badruddin I. A., Mahlia T. M. I., Masjuki H. H. and Mekhilef S. (2012). A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. Renew Sust Energ Rev 16(4): 2070-2093.
- Axelsson M. and Gentili F. (2014). A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. PLoS One 9(2): 1-6.
- Bastawde K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World J Microbiol Biotechnol 8(4): 353-368.
- Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarrea J. L., Molina-Jouve C. and Nicaud J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. Prog Lipid Res 48(6): 375-387.

Bhatia S. K., Kim J., Song H. S., Kim H. J., Jeon J. M., Sathiyarayanan G., Yoon J. J., Park K., Kim Y. G. and Yang Y. H. (2017). Microbial biodiesel production from oil palm biomass hydrolysate using marine *Rhodococcus* sp. YHY01. Bioresour Technol 233: 99-109.

Boulton C. and Ratledge C. (1981). Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of atp- citrate lyase. J Gen Microbiol 127: 169-176.

Boulton C. A. and Ratledge C. (1984). *Cryptococcus terricolus*, an oleaginous yeast re-appraised. Appl Microbiol Biotechnol 20: 72-76.

Browning B. L. (1967). Methods of wood chemistry. New York, Interscience Publishers.

Cancado J. E., Saldiva P. H., Pereira L. A., Lara L. B., Artaxo P., Martinelli L. A., Arbex M. A., Zanobetti A. and Braga A. L. (2006). The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. Environ Health Perspect 114(5): 725-729.

Chen H., Zhang Y., He C. and Wang Q. (2014). Ca²⁺ signal transduction related to neutral lipid synthesis in an oil-producing green alga *Chlorella* sp. C2. Plant Cell Physiol 55(3): 634-644.

Chen X. F., Huang C., Yang X. Y., Xiong L., Chen X. D. and Ma L. L. (2013). Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. Bioresour Technol 143: 18-24.

Cheng K. K., Zhang J. A., Ping W. X., Ge J. P., Zhou Y. J., Ling H. Z. and Xu J. M. (2008). Sugarcane bagasse mild alkaline/oxidative pretreatment for ethanol production by alkaline recycle process. Appl Biochem Biotechnol 151(1): 43-50.

Chi Z. M., Liu T. T., Chi Z., Liu G. L. and Wang Z. P. (2012). Occurrence and diversity of yeasts in the mangrove ecosystems in fujian, guangdong and hainan provinces of china. Indian J Microbiol 52(3): 346-353.

Dasgupta D., Sharma T., Bhatt A., Bandhu S. and Ghosh D. (2017). Cultivation of oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* IIP32 in split column airlift reactor and its influence on fuel properties. Biocatal Agric Biotechnol 10: 308-316.

de Araujo F. V., Soares C. A., Hagler A. N. and Mendonca-Hagler L. C. (1995). Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a southeast Brazilian mangrove ecosystem. Antonie Van Leeuwenhoek 68(2): 91-99.

Demshemino S. I., O'Donnell P. S., Muhammad F. Y., Isioma N. and Linus N. O. (2013). Comparative analysis of biodiesel and petroleum diesel. Int J Educ Res 1(8): 1-8.

Dunlop A. P. (1948). Furfural formation and behavior. Ind Eng Chem Res 40(2): 204-209.

Edgar R. C. (2004). Muscle: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32(5): 1792-1797.

Endoh R., Suzuki M., Benno Y. and Futai K. (2008). *Candida kashinagacola* sp. nov., *C. pseudovanderkliftii* sp. nov. and *C. vanderkliftii* sp. nov., three new yeasts from ambrosia beetle-associated sources. Antonie Van Leeuwenhoek 94(3): 389-402.

Endoh R., Suzuki M., Okada G., Takeuchi Y. and Futai K. (2011). Fungus symbionts colonizing the galleries of the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. Microb Ecol 62(1): 106-120.

Evans C. T. and Ratledge C. (1984). Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. J Gen Microbiol 130: 1693-1704.

Fakas S. (2017). Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. Eng Life Sci 17(3): 292-302.

Fell J. W. (1961). A new species of *Saccharomyces* isolated from a subtropical estuary. Antonie Van Leeuwenhoek 27: 27-30.

Fell J. W., Boekhout T., Fonesca A., Scorzetti G. and Tallman A. S. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1D2 domain sequence analysis. Int J Syst Evol Microbiol 50: 1351-1371.

Fowler S. D., Brown W. J., Warfel J. and Greenspan P. (1987). Use of Nile red for the rapid in situ quantitation of lipids on thin-layer chromatograms. J Lipid Res 28(10): 1225-1232.

Fukuda H., Kondo A. and Noda H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. J Biosci Bioeng 92(5): 405-416.

Gao Q., Cui Z., Zhang J. and Bao J. (2014). Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. Bioresour Technol 152: 552-556.

Gao Z. L., Gu X. H., Cheng F. T. and Jiang F. H. (2003). Effect of sea buckthorn on liver fibrosis: A clinical study. World J Gastroenterol 9(7): 1615-1617.

Garay L. A., Sitepu I. R., Cajka T., Chandra I., Shi S., Lin T., German J. B., Fiehn O. and Boundy-Mills K. L. (2016). Eighteen new oleaginous yeast species. J Ind Microbiol Biotechnol 43(7): 887-900.

Gorain P. C., Bagchi S. K. and Mallick N. (2013). Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. Environ Technol 34(13-16): 1887-1894.

Greenspan P., Mayer E. P. and Fowler S. D. (1985). Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. J Cell Biol 100: 955-977.

Griel A. E., Cao Y., Bagshaw D. D., Cifelli A. M., Holub B. and Kris-Etherton P. M. (2008). A macadamia nut-rich diet reduces total and ldl-cholesterol in mildly hypercholesterolemic men and women. J Nutr 138(4): 761-767.

Groenewald M., Boekhout T., Neuveglise C., Gaillardin C., van Dijck P. W. and Wyss M. (2014). *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Crit Rev Microbiol 40(3): 187-206.

Gullett B. K., Touati A., Huwe J. and Hakk H. (2006). PCDD and PCDF emissions from simulated sugarcane field burning. Environ Sci Technol 40(20): 6228-6234.

Haas M. J. (2005). Animal fats. Bailey's industrial oil and fat products, John Wiley & Sons, Inc.

Hagler A. N., De Oliveira R. B. and Mendonca Hagler L. C. (1982). Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brazil. Antonie Van Leeuwenhoek 48(1): 53-56.

Hall T. A. (1999). Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. Nucleic Acids Symp Ser 41: 95-98.

Hamid S., Khan S. A. and Iqbal M. Z. (1995). Lipid production by *Lipomyces lipoferus*. Lipid / Fett 97(12): 449-452.

Hickey P. W., Sutton D. A., Fothergill A. W., Rinaldi M. G., Wickes B. L., Schmidt H. J. and Walsh T. J. (2009). *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 47(10): 3091-3097.

Holdsworth J. E., Veenhuis M. and Ratledge C. (1988). Enzyme activities in oleaginous yeasts accumulating and utilizing exogenous or endogenous lipids. J Gen Microbiol 134(11): 2907-2915.

Hu C., Zhao X., Zhao J., Wu S. and Zhao Z. K. (2009). Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. Bioresour Technol 100(20): 4843-4847.

Huang C., Zong M. H., Wu H. and Liu Q. P. (2009). Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. Bioresour Technol 100(19): 4535-4538.

Huang G., Chen F., Wei D., Zhang X. and Chen G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. Applied Energy 87(1): 38-46.

Jigami Y., Suzuki O. and Nakasato S. (1979). Comparison of lipid composition of *Candida guilliermondii* grown on glucose, ethanol and methanol as the sole carbon source. Lipids 14(11): 937-942.

Jin M., Slininger P. J., Dien B. S., Waghmode S., Moser B. R., Orjuela A., Sousa Lda C. and Balan V. (2015). Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: Feasibility and challenges. Trends Biotechnol 33(1): 43-54.

Jindamorakot S. (2006). The species diversity of yeasts in some natural habitats of thailand. Doctoral dissertation. Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University.

Jönsson L. J., Palmqvist E., Nilvebrant N.-O. and Hahn-Hägerdal B. (1998). Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Appl Microbiol Biotechnol 49(6): 691-697.

Jutakanoke R. (2014). Screening and strain improvement of yeast for ethanol production from sugarcane leave by SFF process. Doctoral dissertation. Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Jutakanoke R., Leepipatpiboon N., Tolieng V., Kitpreechavanich V., Srinorakutara T. and Akaracharanya A. (2012). Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biomass Bioenergy 39: 283-289.

Kanti A. and Sudiana I. M. (2015). Carboxymethyl cellulose as a C-source for lipid accumulation by the oleaginous yeast *Candida orthopsilosis*. Curr Res Environ Appl Mycol 5(4): 349-356.

Kimura K., Yamaoka M. and Kamisaka Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. J Microbiol Methods 56(3): 331-338.

Kitcha S. and Cheirsilp B. (2011). Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. Energy Procedia 9: 274-282.

Kjeldahl J. (1883). New method for the determination of nitrogen in organic substances. Fresenius J Anal Chem 22: 366-383.

Knothe G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. Fuel Process Technol 86(10): 1059-1070.

Kolouchova I., Sigler K., Schreiberova O., Masak J. and Rezanka T. (2015). New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid. Bioresour Technol 192: 726-734.

Kurtzman C. P., Fell J. W. and Boekhout T. (2011). The yeasts, a taxonomic study. London, Elsevier.

Kurtzman C. P. and Robnett C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses. FEMS Yeast Res 3(4): 417-432.

Leonard R. H. and Hajny G. J. (1945). Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol. Ind Eng Chem 37(4): 390-395.

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

Li Y., Zhao Z. and Bai F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. Enzyme Microb Technol 41(3): 312-317.

Limsuwatthanathamrong M., Sooksai S., Chunhabundit S., Noitung S., Ngamrojanavanich N. and Petsom A. (2012). Fatty acid profile and lipid composition of farm-raised and wild-caught sandworms, *Perinereis nuntia*, the diet for marine shrimp broodstock. Asian J Anim Sci 6(2): 65-75.

Lin J., Li S., Sun M., Zhang C., Yang W., Zhang Z., Li X. and Li S. (2014). Microbial lipid production by oleaginous yeast in D-xylose solution using a two-stage culture mode. RSC Advances 4(66): 34944-34949.

Michely S., Gaillardin C., Nicaud J. M. and Neuveglise C. (2013). Comparative physiology of oleaginous species from the *Yarrowia* clade. PLoS One 8(5): 1-10.

Morgan N. G. and Dhayal S. (2010). Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic β -cell. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 82(4): 231-236.

Ohse S., Bianchini Derner R., Ávila Ozório R., Gordo Corrêa R., Badiale Furlong E. and Roberto Cunha P. C. (2015). Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. Idesia (Arica) 33: 93-101.

Palmqvist E. (1998). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: Inhibition and detoxification. Doctoral dissertation. Department of Applied Microbiology, Lund University.

Palmqvist E. and Hahn-Hägerdal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. Bioresour Technol 74(1): 17-24.

Patel A., Pruthi V., Singh R. P. and Pruthi P. A. (2015). Synergistic effect of fermentable and non-fermentable carbon sources enhances tag accumulation in oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. Bioresour Technol 188: 136-144.

Patel A., Sindhu D. K., Arora N., Singh R. P., Pruthi V. and Pruthi P. A. (2015). Biodiesel production from non-edible lignocellulosic biomass of *Cassia fistula* l. fruit pulp using oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. Bioresour Technol 197: 91-98.

Poontawee R., Yongmanitchai W. and Limtong S. (2017). Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. Process Biochem 53: 44-60.

Quarterman J., Slininger P. J., Kurtzman C. P., Thompson S. R. and Dien B. S. (2017). A survey of yeast from the *Yarrowia* clade for lipid production in dilute acid pretreated lignocellulosic biomass hydrolysate. Appl Microbiol Biotechnol 101(8): 3319-3334.

Ratledge C. (1991). Microorganisms for lipids. Acta Biotechnologica 11(5): 429-438.

Ratledge C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochimie 86(11): 807-815.

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

Ryu B. G., Kim J., Kim K., Choi Y. E., Han J. I. and Yang J. W. (2013). High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. Bioresour Technol 135: 357-364.

Scorpio R. M. and Masoro E. J. (1970). Differences between manganese and magnesium ions with regard to fatty acid biosynthesis, acetyl-coenzyme a carboxylase activity and malonyl-coenzyme a decarboxylation. Biochem J 118: 391-399.

Sitepu I., Selby T., Lin T., Zhu S. and Boundy-Mills K. (2014). Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. J Ind Microbiol Biotechnol 41(7): 1061-1070.

Sitepu I. R., Garay L. A., Sestric R., Levin D., Block D. E., German J. B. and Boundy-Mills K. L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. Biotechnol Adv 32(7): 1336-1360.

Sitepu I. R., Ignatia L., Franz A. K., Wong D. M., Faulina S. A., Tsui M., Kanti A. and Boundy-Mills K. (2012). An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. J Microbiol Methods 91(2): 321-328.

Sitepu I. R., Sestric R., Ignatia L., Levin D., German J. B., Gillies L. A., Almada L. A. and Boundy-Mills K. L. (2013). Manipulation of culture conditions alters lipid content

and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. Bioresour Technol 144: 360-369.

Soccol C. R., Dalmas Neto C. J., Soccol V. T., Sydney E. B., da Costa E. S. F., Medeiros A. B. P. and Vandenberghe L. P. S. (2017). Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. Bioresour Technol 223: 259-268.

Srisuwan W., Techapun C., Seesuriyachan P., Watanabe M. and Chaiyaso T. (2016). Screening of oleaginous yeast for lipid production using rice residue from food waste as a carbon source. KKU Res J 22(1): 116-126.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. (2013). Mega6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30(12): 2725-2729.

Tanimura A., Takashima M., Sugita T., Endoh R., Kikukawa M., Yamaguchi S., Sakuradani E., Ogawa J., Ohkuma M. and Shima J. (2014). *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. Sci Rep 4(4776): 1-6.

Tanimura A., Takashima M., Sugita T., Endoh R., Kikukawa M., Yamaguchi S., Sakuradani E., Ogawa J. and Shima J. (2014). Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. Bioresour Technol 153: 230-235.

Thevenieau F. and Nicaud J.-M. (2013). Microorganisms as sources of oils. Ocl 20(6): 1-8.

Tran A. V. and Chambers R. P. (1985). Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* cbs 5776. Biotechnol Letters 7(11): 841-845.

Tsigie Y. A., Wang C. Y., Truong C. T. and Ju Y. H. (2011). Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresour Technol 102(19): 9216-9222.

Ulbricht R. J., Northup S. J. and Thomas J. A. (1984). A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. Fundam Appl Toxicol 4(5): 843-853.

Wang Q., Cui Y., Sen B., Ma W., Zheng R. L., Liu X. and Wang G. (2017). Characterization and robust nature of newly isolated oleaginous marine yeast *Rhodospiridium* spp. from coastal water of northern china. AMB Express 7(1): 1-30.

Wang Q., Guo F.-J., Rong Y.-J. and Chi Z.-M. (2012). Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making. Renew Energ 46: 164-168.

Wu S., Hu C., Jin G., Zhao X. and Zhao Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. Bioresour Technol 101(15): 6124-6129.

Wu S., Zhao X., Shen H., Wang Q. and Zhao Z. K. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. Bioresour Technol 102(2): 1803-1807.

Yang B. and Wyman C. E. (2009). Cellulosic biomass could help meet california's transportation fuel needs. Calif Agri 63(4): 185-190.

Yang Z. H., Miyahara H. and Hatanaka A. (2011). Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-A^Y mice with genetic type 2 diabetes. Lipids Health Dis 10(120): 1-8.

Yu X., Zeng J., Zheng Y. and Chen S. (2014). Effect of lignocellulose degradation products on microbial biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. Process Biochem 49(3): 457-465.

Yu X., Zheng Y., Dorgan K. M. and Chen S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. Bioresour Technol 102(10): 6134-6140.

Yu X., Zheng Y., Dorgan K. M. and Chen S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. Bioresour Technol 102(10): 6134-6140.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว YM

ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลต์สกัด	3	กรัม
เบคโตเพปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
พีเอช	5.5±0.2	

2. อาหารเหลว YM สูตรดัดแปลงสำหรับการคัดแยกยีสต์

กลูโคส	1	กรัม
ยีสต์สกัด	0.3	กรัม
มอลต์สกัด	0.3	กรัม
เพปโตน	0.5	กรัม
คลอแรมเฟนิคอล	0.0001	กรัม
โซเดียมโพรฟิโอริน	0.025	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
พีเอช	5.0±0.2	

3. อาหารเหลวสูตรไนโตรเจนต่ำ (low-nitrogen medium; High C/N)

กลูโคส	5	กรัม
ยีสต์สกัด	0.1	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.005	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.001%	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.001%	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
พีเอช	5.5±0.2	

4. ไฮโดรไลเสตไบออยสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ

ไฮโดรไลเสตไบออย	1	ลิตร
สารสกัดยีสต์	0.3	กรัม
เพปโตน	0.5	กรัม
ไฮโดรไลเสตไบออย	1	ลิตร
พีเอช	5.5±0.2	



ภาคผนวก ข. สารเคมี

1. Lysis solution ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

Tris 0.5 M พีเอช 8.0	40	มิลลิลิตร
EDTA 0.1 M พีเอช 8.0	60	มิลลิลิตร
10% SDS (น้ำหนัก/ปริมาตร)	10	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	90	มิลลิลิตร

2. Tris 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0

Tris	60.57	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก		

3. EDTA 0.1 โมลาร์ พีเอช 8.0

EDTA	37.224	กรัม
ปราศจากไอออน	1	ลิตร
ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์		

4. สารละลายเอสดีเอสเข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

SDS	10	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

5. โฟแทสเซียมอะซีเตท 2.5 โมลาร์ พีเอช 7.5

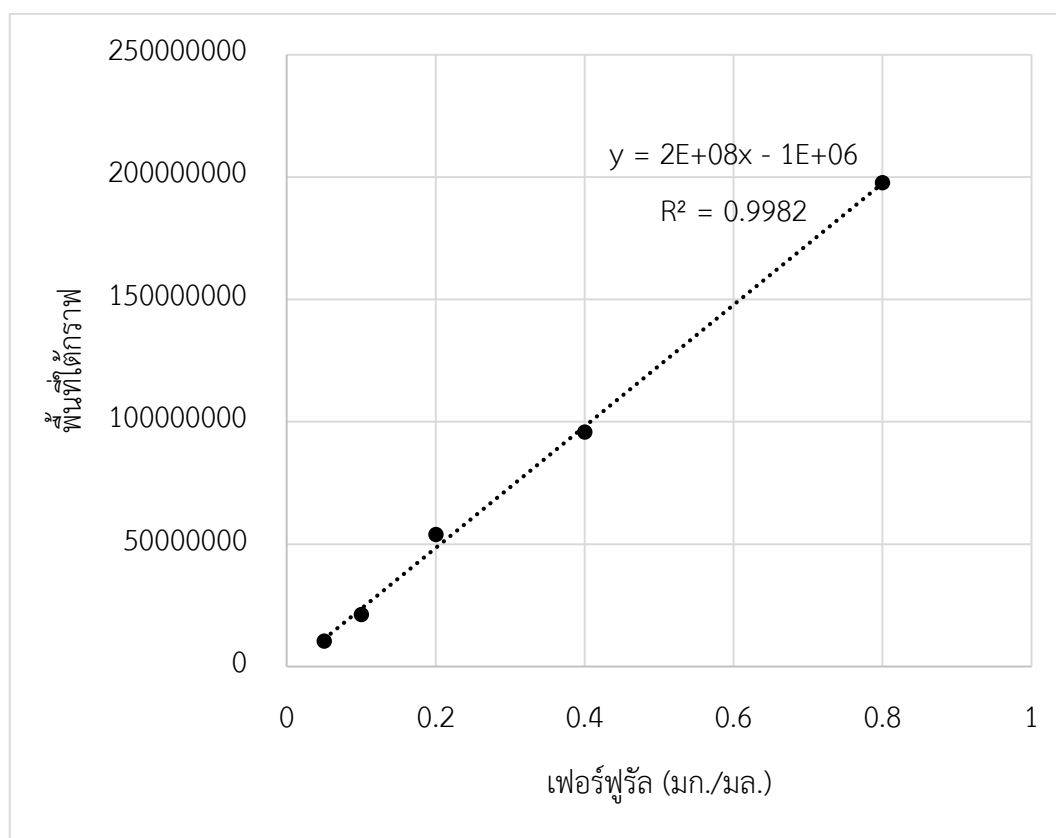
โฟแทสเซียมอะซีเตท	245.35	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	1	ลิตร
ปรับพีเอชด้วยกรดอะซีติก		

3. สีย้อมไนล์เรด เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ไนล์เรด	5	มิลลิกรัม
อะซีโตน	100	มิลลิลิตร

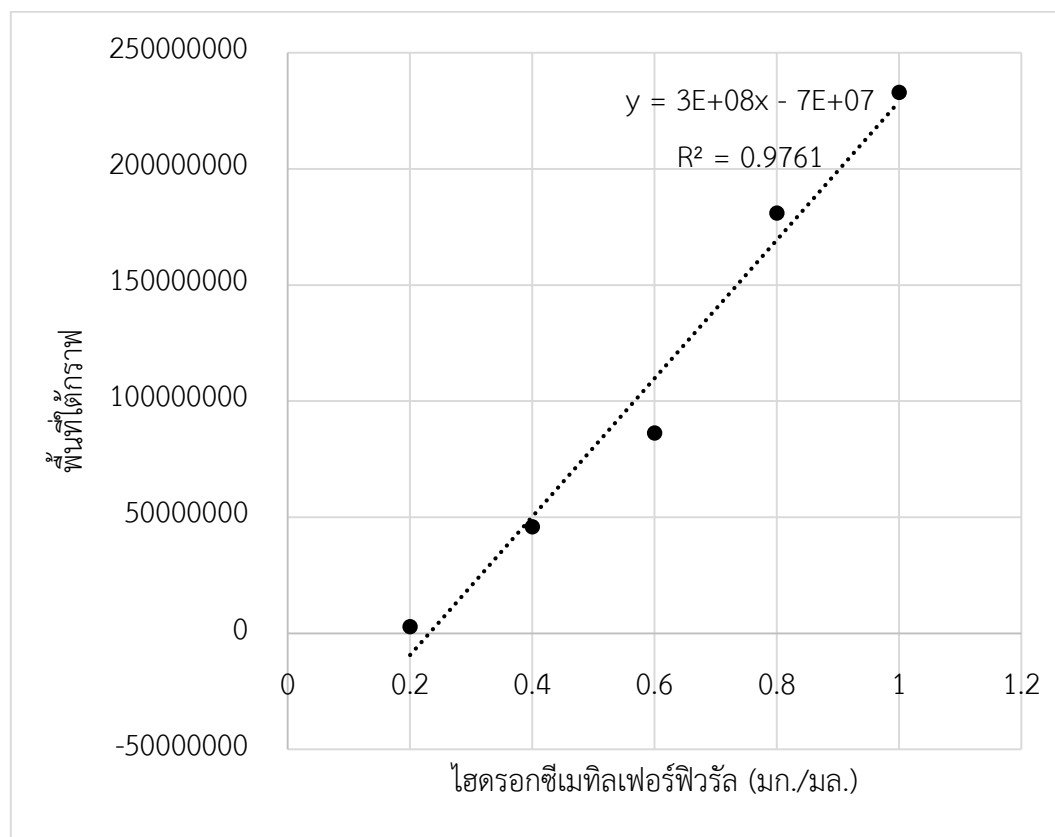
ภาคผนวก ค. กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของเฟอร์ฟูรัล วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



รูปที่ ค - 1 กราฟมาตรฐานของเฟอร์ฟูรัลในช่วงความเข้มข้น 0.05 - 0.8 มก./มล. กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

2. กราฟมาตรฐานของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



รูปที่ ค - 2 กราฟมาตรฐานของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล ที่ช่วงความเข้มข้น 0.1 - 1.0 มก./มล. กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ - นามสกุล	นางสาวรัชชา พระนิมิตร
วัน เดือน ปีเกิด	25 พฤศจิกายน 2535
ภูมิลำเนา	จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
อีเมลล์	ferratchana@gmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2542 - 2548 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเทศบาลวัดธรรมิการาม (ปิยะพานรสังสรรค์) และโรงเรียนอนุบาลประจวบคีรีขันธ์

พ.ศ.2548 - 2554 ระดับมัธยมศึกษาต้น-ปลาย โรงเรียนจุฬาลงกรณ์ราชวิทยาลัย เพชรบุรี (แผนกวิทย์-คณิต)

พ.ศ.2554 - 2558 ระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2558 - 2560 ระดับปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์)

ทุนการศึกษาและวิจัย

1. ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

2. ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

การนำเสนอผลงาน

พ.ศ.2560 นำเสนอผลงานวิชาการที่งานประชุมวิชาการ The 8th RMUTP International Conference on Science, Technology and Innovation for Sustainable Development: Challenges Towards the Digital Society (ICON SCI)