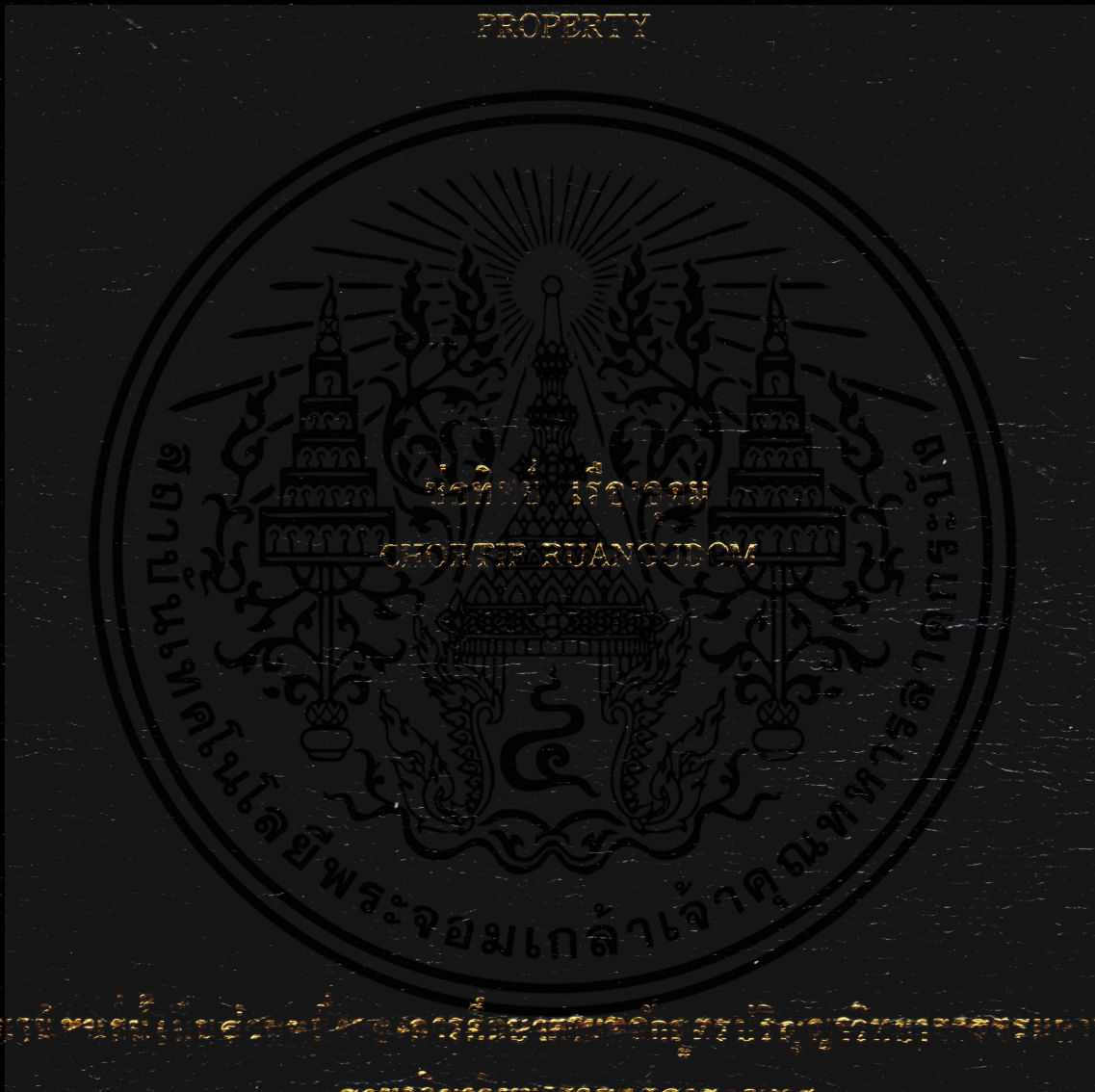


การผลิตไขมันจากอ้อยโดยใช้ยีสต์กิน้ำมัน *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5126 และ  
สมบัติทางเคมีของไขมัน

LIPID PRODUCTION FROM SUGAR CANE BY OLEAGINOUS YEAST  
*RHODOSPORIDIUM TORULOIDES* TISTR 5126 AND LIPID CHEMICAL  
PROPERTY



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่สนับสนุนโดยโครงการวิจัยของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเมือง  
เชียงใหม่

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเมืองเชียงใหม่

กองส่งเสริมการเกษตร

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและข้อมูลข่าวสารเมืองเชียงใหม่

พ.ศ. 2554

KMITL-2012-AI-M-063-128

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตลิพิดจากอ้อยโดยใช้ยีสต์น้ำมัน *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 และ  
สมบัติทางเคมีของลิพิด

LIPID PRODUCTION FROM SUGAR CANE BY OLEAGINOUS YEAST  
*RHODOSPORIDIUM TORULOIDES* TISTR 5123 AND LIPID CHEMICAL  
PROPERTY



T122982

ช่อทิพย์ เรืองอุดม

CHORTIP RUANGUDOM

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน 122982  
ปี ค.ศ. 2555  
วันเดือนปี.....

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

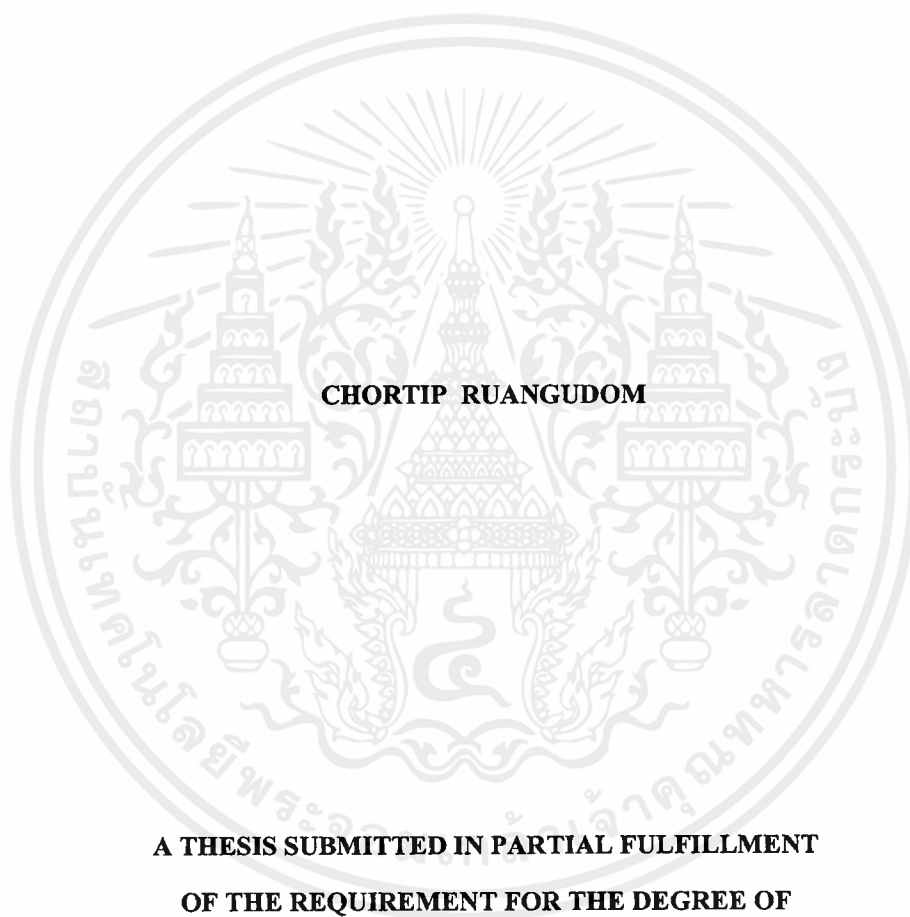
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเอกสารนี้ไปเผยแพร่หรือใช้ประโยชน์ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2012-AI-M-053-128

**LIPID PRODUCTION FROM SUGAR CANE BY OLEAGINOUS YEAST  
*RHODOSPORIDIUM TORULOIDES* TISTR 5123 AND LIPID CHEMICAL  
PROPERTY**



**CHORTIP RUANGUDOM**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE  
AGRO-INDUSTRY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2011**

**KMITL-2012-AI-M-053-128**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**COPYRIGHT 2012**

**AGRO-INDUSTRY**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ หากมีข้อสงสัยหรือข้อผิดพลาดใดๆ กรุณาแจ้งให้ทางสถาบันฯ ทราบเพื่อแก้ไขปรับปรุงให้ถูกต้อง  
"ไม่ว่ากรณีใดๆ หากมีข้อสงสัยหรือข้อผิดพลาดใดๆ กรุณาแจ้งให้ทางสถาบันฯ ทราบเพื่อแก้ไขปรับปรุงให้ถูกต้อง"

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตลิวินจากอ้อยโดยใช้ยีสต์น้ำมัน *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 และสมบัติทางเคมีของลิวิน

นักศึกษา

นางสาวช่อทิพย์ เรืองอุดม

รหัสประจำตัว

52680303

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

พ.ศ.

2554

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง

## บทคัดย่อ

ลิวินจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์น้ำมัน โดยใช้ชีวมวลซึ่งสามารถทดแทนได้ และจัดเป็นแหล่งผลิตทดแทนน้ำมันสำหรับบริโภคและไบโอดีเซล การสะสมลิวินภายในเซลล์ของยีสต์น้ำมันเป็นผลมาจากอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ที่จำกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และปัจจัยในการเพาะเลี้ยงอื่น ๆ ได้เพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 ในอาหารเหลวที่มีน้ำอ้อยเป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้นน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 2.05, 5.09, 8.19, 12.28 และ 16.79 และมีการจำกัดปริมาณของแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดและเปปไทน์ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1, 60:2, 60:3 และ 60:4 ทำการเพาะเลี้ยงในพลาสติกที่สถานะเขย่า ภายใต้อุณหภูมิห้อง (35 องศาเซลเซียส) โดยพบว่าสถานะที่เหมาะสมคือความเข้มข้นน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 จึงเลือกสถานะนี้มาศึกษาการผลิตลิวินที่อุณหภูมิ 10, 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ *Rs. toruloides* TISTR 5123 มีปริมาณลิวินภายในเซลล์ 55.50 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปริมาณเซลล์แห้ง 6.85 กรัมต่อลิตร และปริมาณลิวินทั้งหมด 3.80 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 192 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของลิวินภายใต้อุณหภูมิห้องพบว่าประกอบด้วย กรดปาล์มิติก (ร้อยละ 43.47) กรดโอเลอิก (ร้อยละ 13.79) และกรดสเตียริก (ร้อยละ 6.54) ขณะที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสพบ กรดปาล์มิติก (ร้อยละ 29.63) กรดโอเลอิก (ร้อยละ 26.89) และกรดสเตียริก (ร้อยละ 2.13) โดยเมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงลดต่ำลง ยีสต์น้ำมันจะมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มสูงขึ้น แต่จะทำให้การสะสมลิวินของเซลล์ลดลง จากการวิเคราะห์ทางเคมีในตัวอย่างลิวินพบว่า เลขซาฟอนนิฟิเคชัน ค่าความเป็นกรด ค่าไอโอดีน และค่าเปอร์ออกไซด์เป็น 187.0, 5.7 มิลลิกรัม ไปได้สเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมลิวิน, 57.8 กรัมต่อ 100 กรัมลิวินและ 8.4 มิลลิสมมูลต่อกิโลกรัมตามลำดับ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดทำการวิเคราะห์ในเซลล์ทั้งหมด เซลล์ที่ผ่านการโซนิเคท กากเซลล์ และลิวินสกัดหยาบที่ได้จาก

กระบวนการสกัด ซึ่งเกิดการสูญเสียแคโรทีนอยด์เพียงเล็กน้อยในระหว่างการสกัดลิพิด และยังคงพบปริมาณแคโรทีนอยด์ที่เหลือในลิพิดถึง 3.427 มิลลิกรัมต่อกรัมลิพิด จากการวิเคราะห์องค์ประกอบและสมบัติทางเคมีของลิพิดที่ได้จากยีสต์น้ำมัน *Rs. toruloides* TISTR 5123 มีลักษณะคล้ายกับน้ำมันพืช และเป็นแหล่งทางเลือกที่มีศักยภาพสำหรับผลิตน้ำมันบริโภค เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตรพบว่า ยีสต์มีปริมาณลิพิดภายในเซลล์ 49.37 กรัมต่อ 100 กรัม ปริมาณเซลล์แห้ง 8.97 กรัมต่อลิตร และปริมาณลิพิดทั้งหมด 4.42 กรัมต่อลิตร พารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์มีอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) อัตราการผลิตลิพิดจำเพาะ ( $q_p$ ) และค่าคงที่ของโมนอด ( $K_s$ ) เป็น 0.201 ต่อวัน, 0.099 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 12.302 ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis Title</b>	Lipid production from sugar cane by oleaginous yeast <i>Rhodospiridium toruloides</i> TISTR 5123 and lipid chemical property
<b>Student</b>	Miss Chortip Ruangudom
<b>Student ID.</b>	52680303
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Food Science
<b>Year</b>	2011
<b>Thesis advisor</b>	Dr. Boontiam Panpeng

## ABSTRACT

Microbial lipid can be produced by oleaginous microorganism using renewable biomaterials and considered as renewable source of edible oil and feedstock for biodiesel production. Cellular lipid accumulation of oleaginous yeast is critically affected by the carbon to limited nitrogen ratio (C:N ratio), temperature and other factors of the culture. Oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 was cultivated in liquid medium which contained sugar cane juice as carbon source at concentration of 2.05, 5.09, 8.19, 12.28 and 16.79% invert sugar and limited nitrogen sources as yeast extract and peptone at C:N ratios of 60:1, 60:2, 60:3 and 60:4 in shaking flasks at room temperature (35°C). The maximal yield of lipid content 40.30 g/100 g, dry biomass 6.43 g/l and total lipid 2.59 g/l were obtained in the culture medium which contained sugar cane juice concentration of 5.09% invert sugar and C:N ratios of 60:1. This composition of the culture medium was selected to observe the effect of temperature on lipid accumulation at 10°, 15°, 20°, 25° and 30°C. The optimal temperature was obtained at 20°C which *Rs. toruloides* TISTR 5123 produced lipid content 55.50 g/100 g, dry biomass 6.85 g/L and total lipid 3.80 g/L after 192 hours of cultivation. The major fatty acid compositions of lipid produced at room temperature were palmitic acid (43.47%), oleic acid (13.79%) and stearic acid (6.54%), whereas at 10°C were palmitic acid (29.63%), oleic acid (26.84%) and stearic acid (2.13%). When the cultivating temperature decreased the unsaturation degree of the fatty acids produced by this oleaginous yeast increased but the lipid accumulation decreased. Chemical analysis of the lipid showed saponification number, acid value, iodine value and peroxide value as 187.0, 5.7 mg KOH/g lipid, 57.8 g/100 g lipid and 8.3 meg/kg respectively. Total carotenoid

content in whole cell, sonicated cell, cell residue and cell free crude lipid in the lipid extraction procedure were also analyzed. The carotenoid was slightly lost during lipid extraction and remained 3.427 mg/g crude lipid. Based on the lipid composition and chemical properties, microbial lipids from *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 are similar to those of vegetable oil and a potential alternative oil resource for edible oil production. When culture was performed in 5L stirred tank fermenter, 49.37 g/100 g lipid content, 8.97 g/l dry biomass and 4.42 g/l total lipid were produced. The kinetic parameters, specific growth rate ( $\mu$ ), specific lipid production rate ( $q_p$ ) and Monod's constant ( $K_p$ ) were 0.201 day<sup>-1</sup>, 0.099 g /l day and 12.302 respectively.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะในการดำเนินงานวิจัยนี้ให้ลุล่วงไปด้วยดี รวมไปถึงการให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขงานในหลาย ๆ ด้านที่เป็นประโยชน์ต่อผู้วิจัย และการได้รับโอกาสดี ๆ หลาย ๆ อย่างที่ข้าพเจ้าได้รับมาเป็นความรู้และประสบการณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. บุพร พิษกมูทร ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ และ ดร. ณัฐพล ฟ้าภิญโญ ที่ได้ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์และกรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมในส่วนที่บกพร่องในงานวิจัยให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

ขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่คอยดูแลอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือและสารอาหาร รวมทั้งพี่ ๆ และเพื่อน ๆ นักศึกษาภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและสุขภาพอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยเป็นกำลังใจและช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ของข้าพเจ้า ที่คอยให้กำลังใจ ใฝ่ใจ และให้โอกาสทางด้านการศึกษา ประโยชน์ทั้งหมดที่ได้รับจากงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากทุกท่านที่ได้กล่าวถึงข้างต้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งใจเป็นอย่างมาก

ช่อทิพย์ เรืองอุดม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญภาพ.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 จุลินทรีย์น้ำมัน.....	6
2.2 ยีสต์น้ำมัน.....	8
2.3 ชนิดของลิพิดที่พบในยีสต์.....	8
2.4 การผลิตลิพิดของยีสต์.....	13
2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตลิพิดจากยีสต์.....	16
2.6 การใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน.....	18
2.7 แคลโรทีนอยด์.....	20
2.8 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของลิพิดจากยีสต์น้ำมัน.....	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	25
3.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์.....	25
3.2 วัตถุประสงค์.....	25
3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	25
3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	26

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 สถานที่ดำเนินการทดลอง.....	26
3.6 วิธีดำเนินงาน.....	26
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....</b>	<b>30</b>
4.1 ผลของปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นและอัตราส่วนคาร์บอนต่อ ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตลิพิดของยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่ง คาร์บอน.....	30
4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ การผลิตลิพิด และองค์ประกอบของลิพิด จากยีสต์.....	35
4.3 ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีของลิพิดที่ผลิตโดยยีสต์ <i>Rhodosporidium</i> <i>toruloides</i> TISTR 5123.....	39
4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด.....	40
4.5 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 แบบแขวนในถังหมักแบบกวน ขนาด 5 ลิตร.....	41
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>45</b>
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	45
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	46
<b>บรรณานุกรม.....</b>	<b>47</b>
<b>ภาคผนวก</b>	
ก. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	54
ข. การเตรียมสารเคมี.....	57
ค. วิธีการวิเคราะห์.....	61
ง. ผลการทดลอง.....	74

เอกสารนี้เป็นเอกสาร  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

## สารบัญ (ต่อ)

ประวัติผู้เขียน.....	หน้า 79
----------------------	------------



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนชนิดต่าง ๆ.....	11
2.2 เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันที่ผลิตโดย <i>Rhodosporidium toruloides</i> DMKU3-TK16 กับน้ำมันพืชชนิดอื่น ๆ.....	17
2.3 องค์ประกอบของน้ำอ้อย.....	19
2.4 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันพืชที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ .....	23
4.1 สมบัติทางเคมีของที่ผลิตโดยลิวคิยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123.....	39
4.2 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดจากลิวคิยีสต์ที่เพาะเลี้ยง ในอาหารที่มีน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 กรัม อัตราส่วนคาร์บอน ต่อไนโตรเจน 60:1.....	41
4.3 ค่าของพารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123.....	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 วงจรชีวิตของยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> .....	7
2.2 สูตรโครงสร้างของกลีเซอไรด์.....	9
2.3 สูตรทั่วไปของฟอสโฟลิพิดชนิดต่างๆ.....	12
2.4 กลไกการสังเคราะห์ลิพิดของยีสต์และรา.....	14
2.5 โมเดลการพัฒนาเป็นเม็ดพาคีเลลของลิพิด.....	15
2.6 โครงสร้างของแคโรทีนชนิดต่าง ๆ.....	21
4.1 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 ที่ปริมาณ น้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 2.05 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน แตกต่างกัน.....	30
4.2 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 ที่ปริมาณ น้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน แตกต่างกัน.....	31
4.3 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 ที่ปริมาณ น้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 8.19 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน แตกต่างกัน.....	32
4.4 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 ที่ปริมาณ น้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 12.28 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 144 ชั่วโมง.....	33
4.5 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 ที่ปริมาณ น้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 16.79 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน แตกต่างกัน.....	33
4.6 เปรียบเทียบการผลิตลิพิดโดยยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้น และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตก ต่างกัน.....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.7 การเจริญของยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 เข้าสู่ระยะ สเตรชันนารี ภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท เริ่มต้นร้อยละ 5.09 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1.....	36
4.8 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 ที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1.....	37
4.9 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในตัวอย่างลิพิดจากยีสต์น้ำมัน <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ.....	38
4.10 การเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ ในระหว่างการผลิตลิพิดโดย <i>Rhodosporidium toruloides</i> TISTR 5123 ในน้ำอ้อยที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1.....	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

จากวิกฤตการณ์การขาดแคลนแหล่งพลังงานคาดว่าในอนาคตจะมีการนำวัตถุดิบทางการเกษตรที่ใช้ในการผลิตอาหารมาใช้ในการผลิตพลังงาน ซึ่งจะส่งผลให้อาหารขาดแคลนและมีราคาแพง วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำมันบริโภคก็เป็ยวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลเพื่อเป็นพลังงานทดแทน ทำให้น้ำมันบริโภคขาดแคลนและมีราคาเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม นอกจากนี้ การผลิตน้ำมันจากพืชและสัตว์ยังมีข้อจำกัดอีกหลายประการ คือ ต้องใช้พื้นที่มาก ใช้ระยะเวลานาน การเกิดโรคและขึ้นกับฤดูกาลและสภาพภูมิอากาศ ทำให้มีผลผลิตที่ไม่แน่นอน ส่งผลให้น้ำมันที่ใช้ในการประกอบอาหารมีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น การหาแหล่งของการผลิตน้ำมันเพื่อทดแทนน้ำมันจากพืชและสัตว์จึงนับว่ามีความสำคัญและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาแหล่งของการผลิตใหม่ (Stene และคณะ, 2003; Grandhi และ Weete, 1991)

การผลิตน้ำมันบริโภคจากจุลินทรีย์ทดแทนน้ำมันจากพืชหรือสัตว์เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งมีข้อได้เปรียบคือ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไม่ขึ้นกับฤดูกาลและสภาพอากาศ มีการเจริญเติบโตเร็วจึงใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้น ใช้พื้นที่น้อย ใช้วัตถุดิบได้หลากหลายชนิด และสามารถควบคุมการผลิตได้ซึ่งนับเป็นจุดสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมที่ยั่งยืน (Stene และคณะ, 2003; Grandhi และ Weete, 1991) ในขณะเดียวกันยีสต์บางชนิดยังมีการผลิตตรงควัดคู่พร้อมกับการสะสมลิพิด ตัวอย่างเช่น ยีสต์น้ำมันในสกุล *Rhodotorula* sp. และ *Rhodospiridium* sp. ซึ่งผลิตตรงควัดคู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ การผลิตน้ำมันจากยีสต์สกุลดังกล่าวจึงมีแคโรทีนอยด์เป็นผลพลอยได้ ซึ่งแคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ โดยช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ ช่วยลดการทำลายของเนื้อเยื่อในเซลล์ และป้องกันโรคข้อกระดูก (Maldonade และคณะ, 2008; Weeks, 2003) ในปัจจุบันจึงมีการใช้กันมากทั้งในทางเภสัชกรรมและในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ยีสต์ยังเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลได้ดี ทั้งในการเจริญและการสังเคราะห์สารภายในเซลล์ จึงสามารถนำวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ผลผลิตทางการเกษตรที่มีปริมาณน้ำตาลสูงจึงถูกพิจารณาเป็นอันดับแรกๆ ได้แก่ น้ำอ้อยและกากน้ำตาลชนิดต่างๆ ทั้งนี้เพื่อเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบ และสามารถลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยง

อ้อยถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญทั้งในอุตสาหกรรมน้ำตาลทราย และการผลิตเอทานอล จึงมีการเพาะปลูกมากในประเทศไทย (67-70 ล้านตันอ้อยต่อปี) (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2553) มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก และยังประกอบด้วยวิตามินและแร่ธาตุชนิดต่างๆ ซึ่งยีสต์สามารถใช้เป็นสารอาหารได้ดี (Wolford, 1996) นอกจากนี้ น้ำอ้อยยังเป็นวัตถุดิบราคา

ถูก จึงน่าจะนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมันในการผลิตน้ำมัน น้ำมันจากยีสต์มีองค์ประกอบของกรดไขมันที่จำเป็นในกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายชนิด สายพันธุ์ยีสต์น้ำมันเช่น *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Lipomyces* sp. สามารถสะสมลิพิดได้สูงกว่าร้อยละ 70 ของน้ำหนักแห้ง (dry biomass) (Sakuradani และ Shimizu, 2009; พรพจน์, 2549; Zhu และ Walters-Pollak, 2006) การเจริญและสะสมลิพิดของยีสต์ขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างปริมาณของแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจน (C:N ratio) ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเพาะเลี้ยงเป็นสำคัญ โดยมี C:N ratio เป็นปัจจัยหลัก เมื่อเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มี C:N ratio สูงและอุณหภูมิต่ำจะทำให้เกิดการ ทำงานของเอนไซม์ซิเตรทไลเอส (citrate lyase, ACL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะในการสังเคราะห์กรดไขมันของยีสต์น้ำมันเท่านั้น (Lederberg, 1992; Ratledge, 2002) ปัจจัยรองลงมาคืออุณหภูมิ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ควบคุมชนิดของกรดไขมันภายในเซลล์ เมื่อยีสต์น้ำมันมีการเจริญภายใต้ อุณหภูมิต่ำ จะมีอัตราการเจริญและปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวลดลง เนื่องจากอุณหภูมิต่ำจะเป็นตัวยับยั้งระบบเมตาบอลิซึมและการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ ขณะที่จุลินทรีย์น้ำมันจะมีการสังเคราะห์กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำจะชักนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ fatty acid desaturases ซึ่งทำให้เกิดพันธะคู่ในกรดไขมันที่เชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีจุดหลอมเหลวต่ำและมีความยืดหยุ่นสูง ซึ่งจะช่วยให้มีการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น (Rodriguez-Vargas และคณะ, 2007; Suutari และคณะ, 1997; Rose และ Harrison, 1987)

ในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตลิพิดของยีสต์น้ำมัน *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 โดยใช้ น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อให้เกิดการผลิตลิพิดในปริมาณสูง รวมถึงศึกษาองค์ประกอบของลิพิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ ปริมาณแคโรทีนอยด์ สมบัติทางเคมีของน้ำมันที่ได้ และการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในถังหมัก

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตลิพิดจากยีสต์น้ำมัน *Rs. toluroides* TISTR 5123
2. เพื่อศึกษาสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของลิพิดที่ผลิตโดยยีสต์น้ำมัน
3. เพื่อศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์ที่เป็นผลพลอยได้
4. เพื่อศึกษาการขยายขนาดของการผลิตลิพิด โดยเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิพิดจากยีสต์น้ำมัน *Rs. toluroides* TISTR 5123 โดยใช้ น้ำอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน และจะคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้น อัตราส่วนคาร์บอนต่อ ไนโตรเจน และอุณหภูมิ มาศึกษาต่อในระดับถัดมา พร้อมทั้งศึกษาสมบัติทางเคมีของลิพิด และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตน้ำมันจากน้ำอ้อยโดยใช้ยีสต์น้ำมัน *Rs. toluroides* TISTR 5123
2. ทราบถึงสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันที่ได้เพื่อนำไปใช้ทดแทนน้ำมันบริโภคจากพืชและสัตว์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 จุลินทรีย์น้ำมัน

สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในกลุ่มของยูคาริโอตที่สามารถผลิตและสะสมลิพิดได้ ถูกเรียกว่า จุลินทรีย์น้ำมัน (oleaginous microorganism) ซึ่งจะสามารถสะสมสารในกลุ่มของไตรกลีเซอไรด์ไว้ภายในเซลล์ บางครั้งปริมาณลิพิดอาจสูงถึงร้อยละ 70 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยสามารถจำแนกจุลินทรีย์น้ำมันเป็น 3 กลุ่มคือ

##### 2.1.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว แต่จะให้ปริมาณเซลล์และลิพิดต่ำเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์อื่น อีกทั้งองค์ประกอบของเซลล์มีความซับซ้อนและยุ่งยากต่อการสกัด มีแนวโน้มก่อโรคและพบปัญหาสารพิษเจือปนค่อนข้างมาก จึงไม่นิยมนำมาใช้ในการผลิต แต่ก็ยังมีการศึกษาวิจัยการผลิตสารในกลุ่มลิพิดจากแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มที่แยกได้จากทะเล Kalscheuer และคณะ (2007) ได้ศึกษาถึงการสะสมลิพิดในแบคทีเรีย *Alcanivorax borkumensis* SK2 ซึ่งมีถิ่นที่อยู่ในทะเลน้ำลึก โดยพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้จะมีการสะสมสารในกลุ่มไตรกลีเซอไรด์และลิพิดเป็นองค์ประกอบหลัก โดยไตรกลีเซอไรด์ประกอบด้วยกรดไขมันมากกว่าร้อยละ 23 ของน้ำหนักเซลล์แห้งและกรดไขมันส่วนใหญ่เป็นชนิดอิ่มตัว ขณะที่ Patmayak และ Sree (2005) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันเซลล์เดี่ยว (single cell oil) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) โดยคัดแยกแบคทีเรียได้ 2 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis* (RRL-8) จากฟองน้ำทะเลชนิด *Aurora globostellata* และ *Pseudomonas* spp. (RRL-28) จาก *Heteronema erecta* ซึ่งสามารถผลิตลิพิดได้ถึงร้อยละ 16.9 และ 31.7 ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจะทำให้มีการผลิตลิพิดเพิ่มเป็นร้อยละ 33.4 และ 42.7 ตามลำดับ ทั้งนี้แบคทีเรียทั้งสองชนิดยังสามารถผลิตกรดไขมันแกมมาลิโนเลอิก ( $\gamma$ -linolenic acid, 18:3) ซึ่งเป็นโอเมกา 6 ได้ร้อยละ 4.5 และ 1.12 ตามลำดับ ขณะที่ยังตรวจพบกรดไอโคซาเพนตาอีนอิก (eicosapentaenoic acid, 20:5) เฉพาะใน *B. subtilis* (RRL-8) โดยสามารถผลิตได้ร้อยละ 3.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

##### 2.1.2 สาหร่าย

สาหร่ายจัดเป็นแหล่งผลิตลิพิดที่ดี สามารถสังเคราะห์แสงและใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน รวมไปถึงยังสามารถผลิตก๊าซมีเทนในสถานะที่ไม่มีอากาศ ขณะที่เซลล์ของสาหร่ายเป็นแหล่งของ โอเมกา 3 (omega 3) และ โอเมกา 6 (omega 6) รวมถึงกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด

ได้แก่ ลิวซีน วาลีน ไอโซลิวซีน เป็นต้น แต่มีการเจริญเติบโตช้า ต้องใช้แสงแดดและพื้นที่ในการเลี้ยง อีกทั้งยังพบปัญหาเรื่องการกำจัดคลอโรฟิลล์ออกและต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวสูง สาหร่ายที่สามารถผลิตลิพิดได้สูง เช่น *Botryococcus branuii*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Nitzschia* sp. และ *Schizochytrium* sp. เป็นต้น โดยปัจจัยที่ควบคุมการผลิตชนิดของลิพิดคือยีนและความหลากหลายของโปรตีนซึ่งจะเกี่ยวข้องโดยตรงต่อการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว เช่น กรดอะราชิโดนิก กรดโอไลซาเพนตาอีโนอิก และ กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก นอกจากนี้องค์ประกอบสำคัญที่เป็นตัวควบคุมยังขึ้นกับสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง หรือแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น (Guschina และ Harwood, 2006; Meng และคณะ, 2009) จากการศึกษาของ Dermirbas (2009) ได้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายขนาดใหญ่ (*Cladophora fracta*) และสาหร่ายขนาดเล็ก (*Chlorella protothecoides*) มีประสิทธิภาพในการผลิตลิพิดได้ไม่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันพบว่า *Ch. protothecoides* สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (ร้อยละ 62.8) ได้มากกว่า *Cl. fracta* (ร้อยละ 50.9) และลิพิดที่ผลิตได้จากสาหร่ายทั้งสองชนิดยังมีสมบัติคล้ายกับลิพิดที่ได้จากพืช

### 2.1.3 ราและยีสต์

ราและยีสต์จัดเป็นแหล่งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูง ลิพิดที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม ซึ่งเหมือนกับน้ำมันจากพืช แต่จะต่างกันตรงการจัดเรียงตัวของกรดไขมันในองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ การเลี้ยงไม่ต้องใช้พื้นที่มาก ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้น ลิพิดที่ได้ไม่มีปัญหาสารพิษปนเปื้อน และสามารถสกัดลิพิดออกจากเซลล์ได้ง่ายกว่าในแบคทีเรีย รัตนภรณ์ ลีสิงห์ (2551) ได้ศึกษาการผลิตลิพิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่น ไขมันสูงพบว่า ยีสต์ที่ทำการคัดแยกได้ สามารถผลิตลิพิดทั้งหมด (total lipid) ได้ถึง 4.10 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 52.7 ของน้ำหนักแห้ง และเมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของลิพิดโดยแก๊สโครมาโตกราฟีพบว่า เป็นกรดไขมันสายยาวที่มีคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม ซึ่งมีกรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืช ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตไบโอดีเซล โดยได้มีการศึกษาการผลิตลิพิดจากรา *Mucor circinelloides* เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่ง *M. circinelloides* สามารถผลิตลิพิดได้มากกว่าร้อยละ 85 และสามารถใช้กรดเป็นตัวแทนทำปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนสภาพของลิพิดให้อยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl esters, FAMES) และพร้อมจะเข้ากระบวนการเพื่อผลิตไบโอดีเซล (Ruiz-Vazquez และคณะ, 2009) ขณะที่ Vicente และคณะ (2010) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงรา *M. circinelloides* บนอาหารแข็งเพื่อผลิตไบโอดีเซล ซึ่งจะช่วยให้รามีการผลิตและสะสมลิพิดเพิ่มมากขึ้น และสามารถนำลิพิดที่ได้มาผ่านกระบวนการเพื่อผลิตไบโอดีเซลได้ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว นอกจากนี้ Liu และคณะ (2010) ได้ศึกษาราทั้งหมด 61 ไม่ว่ากรณิ ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากดินในป่าของจังหวัดสุรนาน ประเทศจีนมาทดสอบความสามารถในการสะสมลิพิด พบว่ารารหัส SCIM 3.009 ซึ่งจำแนกได้เป็น *Thamnidium ctenidium* สามารถสะสม

ลิวินได้ถึงร้อยละ 50.4 ของน้ำหนักแห้ง และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันพบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันที่ได้จากพืช โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาวและกรดไขมันอิ่มตัวสายยาวในปริมาณที่ต่ำ จากการหาสภาวะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพบว่า *T. ctenidium* สามารถผลิตลิวินได้สูงถึงร้อยละ 66.02 ของน้ำหนักแห้ง มีปริมาณน้ำหนักแห้งและการผลิตลิวินทั้งหมด  $13.6 \pm 0.37$  และ  $20.6 \pm 0.52$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีปริมาณเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน 3.0 กรัมต่อลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 อัตราการเขย่า 220 รอบต่อนาที

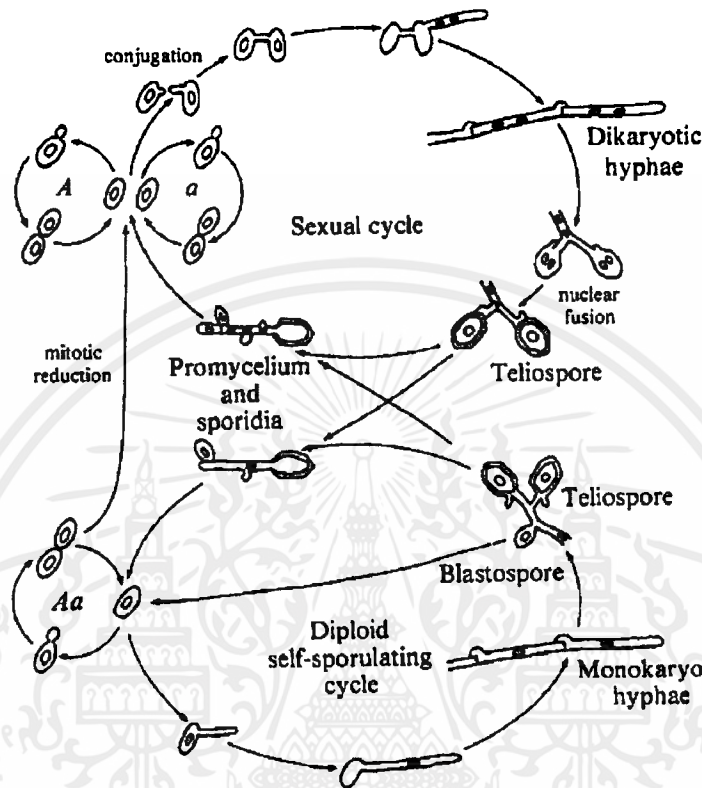
## 2.2 ยีสต์น้ำมัน

ยีสต์ในธรรมชาติมีมากมายหลายสายพันธุ์ การเจริญ ลักษณะวงจรชีวิตและกระบวนการเมแทบอลิซึมจึงมีความเฉพาะและแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณเกลือ ปริมาณน้ำตาลและองค์ประกอบของอาหาร จากยีสต์ทั้งหมด 600 กว่าสายพันธุ์ มีประมาณ 30 สายพันธุ์ที่สามารถสะสมลิวินได้มากกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนักแห้ง โดยยีสต์ที่มีคุณสมบัตินี้จัดเป็นยีสต์น้ำมัน (oleaginous yeast) และบางสายพันธุ์อาจสูงถึงร้อยละ 70 ของน้ำหนักแห้ง โดยชนิดและปริมาณลิวินที่พบจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์และสภาวะในการเพาะเลี้ยง สายพันธุ์ของยีสต์ที่ผลิตน้ำมันได้แก่ *Candida*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofer*, *Rhodospiridium* sp. และ *Yarrowia lipolytica* เป็นต้น (Ratledge และ Evans, 1989)

*Rhodospiridium* sp. จัดอยู่ในจีนัสเฮเทอโรเบสิดิโอไมซีตัส (genera heterobasidiomycetous) สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยสร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) จากเบซิเดียม (basidium) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งมีสีส้ม เหลืองและแดง เนื่องมาจากรงควัตถุที่ให้สีคือ แคโรทีนอยด์ สามารถเจริญได้ทั้งที่เป็นเซลล์ยีสต์และเส้นใย ในเฟสที่เป็นเซลล์ยีสต์ เซลล์จะมีลักษณะเป็นรูปไข่ที่ยึดยาวออก (Abe และ Sasakuma, 1986) ดังภาพที่ 2.1 สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อหรืออาจฟอร์มตัวเป็นเส้นใยเทียม (pseudomycelium) การฟอร์มตัวเป็นเส้นใยจะทำให้ยีสต์มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และสามารถพัฒนาไปเป็นสปอร์ (self-sporulation) เส้นใยไมซีเลียอาจเกิดลักษณะของแคลมป์คอนเนคชัน (clamp connection) หรือไม่เกิดก็ได้ โครงสร้างผนังกันเส้นใยมีรูเพียง 1 รู (simple pore) และจะเป็นเทลโลสปอร์ (teliospores) ในช่วงสุดท้าย ต่อมาจึงมีการอกเป็นก้านหรือสร้างผนังกันภายในเส้นใย (Abe และ Sasakuma, 1986)

ยีสต์ในกลุ่มนี้ไม่มีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาล ไม่สร้างกรดหรือแอลกอฮอล์ สามารถยอนน้ำตาลได้หลายชนิดได้แก่ กลูโคส ฟรักโทส ซูโครส ไซโลส กาแล็กโตส ทรีฮาโลส เป็นต้น มีคุณสมบัติในการสะสมลิวิน โดยจะสะสมลิวินในรูปของหยดน้ำมันเล็กๆ ภายในเซลล์ ซึ่งมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นไตรกลีเซอไรด์ เมื่อผ่านการสกัดลิวินแล้วลิวินที่ได้จะเป็นกรดไขมัน

อิสระและลิพิดชนิดอื่น เช่น พวกลิปอโพลีปิด สเตอรอล หรือเอสเทอร์ของสเตอรอล เป็นต้น ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (Fell และ Kurtzman, 1998)



ภาพที่ 2.1 วงจรชีวิตของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides*

ที่มา : Abe และ Sasakuma (1986)

เนื่องจาก *Rhodosporidium* sp. เป็นยีสต์ในกลุ่มที่สามารถผลิตลิพิดได้สูง และไม่พบสารเจือปนเช่น แอลกอฮอล์ หรือกรด จึงมีการวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นแหล่งผลิตกันมาก Evans และ Ratledge (1984) ได้ศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิดในยีสต์น้ำมันทั้งหมด 17 สายพันธุ์พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์จะช่วยทำให้ยีสต์มีการผลิตลิพิดสูงขึ้น โดยเฉพาะยีสต์ *Rs. toruloides* CBS 14 ซึ่งจะมีลิพิดสะสมเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์เมื่อใช้ กลูตามัทยูเรียหรืออาร์จินีนเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยการใช้กลูตามัทจะไม่ทำให้ปริมาณลิพิดเพิ่มสูงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง แต่การสะสมลิพิดจะเกิดได้ดีในสภาวะการเลี้ยงแบบแบช ซึ่งกลไกการสะสมลิพิดนี้เกี่ยวข้องกับโดยตรงกับปริมาณแอมโมเนียมอิสระและปริมาณซิเตรทภายในเซลล์ ขณะที่ Li และคณะ (2006) ได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิพิดของยีสต์ *Rs. toruloides* Y4 โดยพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารที่มีส่วนประกอบคือ กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 0.75 กรัมต่อลิตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.5 นำเชื้อและเติมแร่ธาตุ  $\text{ZnSO}_4$   $1.91 \times 10^{-6}$  mmol/l,  $\text{CaCl}_2$  1.5 mmol/l,  $\text{MnCl}_2$   $1.22 \times 10^{-4}$

mmol/l และ  $\text{CuSO}_4 \cdot 1 \times 10^{-4}$  mmol/l โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาพเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 วัน จะทำให้ยีสต์สามารถสะสมลิพิดได้สูงถึงร้อยละ 76 โดยน้ำหนักแห้ง มีปริมาณเซลล์ 18.2 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยีสต์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *Rhodosporidium* sp. คือ *Rhodotorula* sp. ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตและสะสมลิพิดก็ถูกนำมาศึกษากันมากเช่นกัน

Saxena และคณะ (1998) ได้ศึกษาถึงลิพิดและกรดไขมันที่ผลิตจากยีสต์ *R. minuta* โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ *R. minuta* IIP-33 รวมถึงศึกษาถึงคุณสมบัติของลิพิดที่สะสมในยีสต์ พบว่าเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 30 จะทำให้ยีสต์มีการสะสมลิพิดได้สูงสุดถึงร้อยละ 48 โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงร้อยละ 22.5 และลิพิดที่วิเคราะห์ได้ ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 7 ถึง 18 อะตอม ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันจะแตกต่างกันไปตามอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม เช่นเดียวกับ อัจฉรวรรณ ทองมี (2530) ที่ศึกษาการสกัดลิพิดจากยีสต์ *R. gracilis* พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 75 จะทำให้ยีสต์ผลิตกรดไขมันได้มากที่สุดคือร้อยละ 34.2 ของน้ำหนักแห้ง โดยมีองค์ประกอบหลักคือ กรดปาล์มิติกร้อยละ 38 กรดโอเลอิกร้อยละ 27 กรดสเตียริกร้อยละ 13 และปาล์มิตอเลอิกร้อยละ 11 โดยทำการหาปริมาณลิพิดทั้งหมดด้วยวิธี colorimetric method วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร ขณะที่ Dai และคณะ (2007) ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำมันจากยีสต์ด้วยอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้รหัส T216 ซึ่งจำแนกชนิดได้เป็น *R. glutinis* สามารถผลิตลิพิดได้ร้อยละ 49.25 ของน้ำหนักแห้ง ปริมาณลิพิดทั้งหมด 14.66 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อทดแทนแหล่งคาร์บอนด้วยไซรัปที่ได้จากซางข้าวโพดและใบของต้นเทพทาโร (*Populus euramevicana*) ซึ่งมีกลูโคสและไซโลสเป็นองค์ประกอบหลักพบว่ายีสต์สามารถผลิตลิพิดได้ร้อยละ 11.78 และ 28.59 ตามลำดับ

## 2.3 ชนิดของลิพิดที่พบในยีสต์

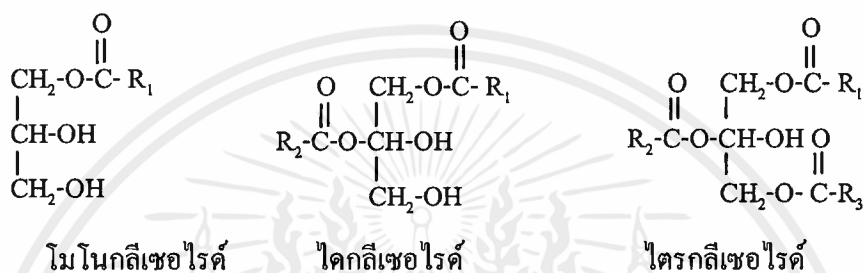
องค์ประกอบและชนิดของลิพิดที่พบในยีสต์น้ำมันจะแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ส่วนใหญ่สภาวะที่เหมาะสมจะเป็นตัวควบคุมปริมาณลิพิดและกรดไขมัน แต่สายพันธุ์ของยีสต์จะเป็นตัวควบคุมชนิดของลิพิด โดยชนิดของลิพิดที่พบในยีสต์น้ำมันได้แก่

### 2.3.1 กลีเซอไรด์ (glyceride)

กลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตลิพิดจากยีสต์ โดยหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอไรด์ อาจถูกแทนที่ด้วยกรดไขมันได้ตั้งแต่ 1, 2 และ 3 ตำแหน่ง ซึ่งจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปคือ โมโน ไค และ ไตรกลีเซอไรด์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2.2) ขณะที่ไตรกลีเซอไรด์จะเป็นผลผลิตหลักซึ่งอยู่ในรูปของหยดลิพิดที่สะสมภายในเซลล์ยีสต์ ในการสกัด

จึงจำเป็นต้องทำให้เซลล์แตกก่อน ไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จะประกอบด้วยกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8 ถึง 24 อะตอม (Lederberg, 1992)

กลีเซอไรด์เป็นลิพิดที่พบมากที่สุดในเซลล์ คือ มีถึงร้อยละ 80 ของลิพิดทั้งหมด กลีเซอไรด์ที่พบมากที่สุดในยีสต์ คือ ไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งกรดไขมันที่พบในไตรกลีเซอไรด์ในยีสต์ มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-24 อะตอม โดยชนิดของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอมจะพบมากที่สุดซึ่งมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว (Lederberg, 1992)



ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของกลีเซอไรด์

ที่มา : Lederberg (1992)

กรดไขมันประกอบขึ้นจากการเรียงตัวเป็นสายโซ่ของธาตุคาร์บอนโดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่เมทิล (methyl group,  $-\text{CH}_3$ ) และปลายอีกข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group,  $-\text{COOH}$ ) ซึ่งจำนวนของคาร์บอนมีได้หลายตัว โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 4 ถึง 22 อะตอมหากมีความยาวน้อยกว่า 6 อะตอมจะเรียกว่า กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) หากมีความยาวมากกว่า 12 อะตอม เรียกว่า กรดไขมันสายยาว (long chain fatty acid) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้อาจเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวหรือพันธะคู่ การตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ของกรดไขมัน จะอาศัยความยาวของคาร์บอนตำแหน่งและจำนวนพันธะคู่ภายในสายโซ่คาร์บอนเป็นสำคัญ กรดไขมันสามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ (Lederberg, 1992)

2.3.1.1 กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีธาตุคาร์บอนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวเท่านั้น ส่วนใหญ่เป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งการรับประทานอาหารที่มีลิพิดชนิดอิ่มตัวจะทำให้ลิพิดในเลือดสูงและเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดตีบ แหล่งอาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัวมาก ได้แก่ อาหารที่ได้จากลิพิดสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว เป็นต้น (พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล, 2549)

2.3.1.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีคาร์บอนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวและพันธะคู่ ซึ่งสามารถแบ่งย่อยลงไปได้อีกสองกลุ่มคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ ไม่ควรนำไปใช้เพื่อประโยชน์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid, MUFA) จัดเป็นกรดไขมันที่มีธาตุคาร์บอนในสายโซ่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่เพียงหนึ่งตำแหน่งเท่านั้น ส่วนใหญ่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง เป็นสารอาหารที่แพทย์และนักโภชนาการแนะนำให้รับประทาน เพราะสามารถช่วยลดคอเลสเตอรอล ไคโรลีสเทอโรล และยังช่วยให้เลือดไม่หนืดข้น ซึ่งเป็นผลดีต่อหัวใจ และหลอดเลือด รวมถึงสามารถช่วยลดคอเลสเตอรอลในเลือด อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูง ได้แก่ ถั่วต่างๆ และ ผลมะกอก เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าการสังเคราะห์ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กร่วมกับยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Schizosaccharomyces pombe* ซึ่งจะมีการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 14-26 อะตอม (Martin และคณะ, 2007; พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล, 2549)

2) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) เป็นกรดไขมันที่มีธาตุคาร์บอนในสายโซ่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่หลายตำแหน่ง ที่รู้จักทั่วไปมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม โอเมกา 3 และกลุ่มโอเมกา 6 โดยทั้ง 2 กลุ่มจัดเป็นกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid, EFA) สำหรับร่างกาย (ตารางที่ 2.1) การรับประทานลิพิดกลุ่มนี้จะสามารถลดระดับของคอเลสเตอรอลในร่างกาย ซึ่งกรดไขมันชนิดนี้พบได้ทั่วไปในน้ำมันพืชทั้งหลาย ไม่ว่าจะเป็นน้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกทานตะวัน หรือน้ำมันถั่วเหลือง (พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล, 2549; Picataggio และคณะ, 2007)

Prasitchoke และคณะ (2007) ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดไขมันสายยาวของยีสต์ *Hansenula polymorpha* ซึ่งมีการกลายพันธุ์พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีมีเทนเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สามารถผลิตกรดไขมันสายยาว (C22:0) โดยการสะสมและขนาดความยาวของกรดไขมันจะเกี่ยวข้องกับยีน HpELO1 ซึ่งทำหน้าที่ถอดรหัสกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดไขมัน ขณะที่ Zhu และ Walters-Pollak (2006) ศึกษาการผลิตกรดแกมมาลิโนเลนิก (GLA) ในยีสต์น้ำมันโดยได้คัดลอกยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์  $\Delta 12$  และ  $\Delta 6$  desaturase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนกรดโอเลอิกเป็น GLA จากยีสต์ในสกุล *Candida* sp. ถ่ายลงในยีสต์ *Yarrowia lipolytica* พบว่า *Y. lipolytica* ที่มีการตัดแต่งยีนมีความสามารถในการผลิต GLA มากกว่าสายพันธุ์ปกติ โดยมีการผลิตเพิ่มจากร้อยละ 25.9 เป็น 34.0 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์  $\Delta 17$  desaturase ซึ่งมีความสามารถในการเปลี่ยนกรดอะราซิโดนิก (ARA) เป็นกรดไอโคซาเพนตาอีนอิก (EPA) เมื่อแยกส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัส  $\Delta 17$  desaturase (ยีน PaD17) จากยีสต์ *Phytophthora aphanidermatum* ถ่ายลงในยีสต์ *Y. lipolytica* และเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม พบว่า *Y. lipolytica* มีความสามารถในการเปลี่ยน ARA เป็น EPA ได้มากขึ้น (Yadav และคณะ, 2009)

เอกสารนี้เป็นสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนชนิดต่าง ๆ

ชื่อสามัญ	ตัวย่อ	ชื่อวิทยาศาสตร์	สัญลักษณ์
Linoleic	LA	Cis-9,12-octadecadienoic	18:2 Ω-6
γ-linoleic	GLA	Cis-6,9,12-octadecatrienoic	18:3 Ω-6
Dihomo-γ-Linoleic	DGLA	Cis-8,11,14-eicosatrienoic	20:3 Ω-6
Arachidonic	ARA	Cis-5,8,11,14-eicosatetraenoic	20:4 Ω-6
α-Linolenic	ALA	Cis-9,12,15-octadecatrienoic	18:3 Ω-3
Stearidonic	STA	Cis-6,9,12,15-octadecatetraenoic	18:4 Ω-3
Eicosatetraenoic	ETA	Cis-8,11,14,17-eicosatetraenoic	20:4 Ω-3
Eicosapentaenoic	EPA	Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	20:5 Ω-3
Docosapentaenoic	DPA	Cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoic	22:5 Ω-3
Docosahexaenoic	DHA	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic	22:6 Ω-3

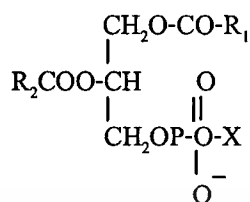
ที่มา : Picataggio และคณะ (2007)

Ye (2009) พบว่ายีสต์น้ำมัน *Y. lipolytica* ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม สามารถผลิต เอนไซม์ คิวเทน (coenzyme Q10) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนชนิดโอเมกา 3 และโอเมกา 6 ได้บางส่วน และยังสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยได้ทำการตัดต่อยีน จากยีสต์น้ำมัน (*Yarrowia, Candida, Rhodosporidium sp.* เป็นต้น) ที่มีการสะสมลิพิดได้ถึงร้อยละ 25-40 ลงใน *Y. lipolytica* สายพันธุ์ต่างๆ พบว่า *Y. lipolytica* ATCC 20362, ATCC 8862, ATCC 18944, ATCC 76982 และ LGAMS 1 สามารถผลิตปริมาณลิพิดทั้งหมดได้มากกว่าสายพันธุ์ปกติ เมื่อคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งเซลล์

### 2.3.2 ฟอสโฟลิพิด (phospholipids)

ฟอสโฟลิพิดเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล และมีหมู่ฟอสฟาติกเป็นองค์ประกอบ ฟอสโฟลิพิดที่พบในธรรมชาติเป็นพวกแอลฟอร์ม (L-form) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ สูตรโครงสร้างทั่วไปของฟอสโฟลิพิดแสดงดังภาพที่ 2.3 ฟอสโฟลิพิดจะถูกสังเคราะห์บริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย โดยมีโคเอซิลกลีเซอรอลและเอซิล โคเอเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ ฟอสโฟลิพิดที่พบในยีสต์ส่วนใหญ่เป็นฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidyl choline) ซึ่งพบว่ามีประมาณร้อยละ 35-50 ของฟอสโฟลิพิดทั้งหมด และส่วนน้อยจะเป็นพวกฟอสฟาติลอินโนซิทอล ฟอสโฟลิพิดเป็นกุญแจสำคัญในการปรับตัวเพื่อเจริญในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ รวมถึงการสะสมลิพิด และการตอบสนองต่อสภาพธรรมชาติ ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันใน

ฟอสโฟลิพิดจะส่งผลโดยตรงต่อคุณสมบัติการไหลของสารภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (Suutari และคณะ, 1997; Blagovic และคณะ, 2001; Carman และ Han, 2009)



X: glycerophospholipid โดย X อาจเป็นเช่น

- H : phosphatidic acid (PA)
- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub> : phosphatidylethanolamine (PE)
- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> : phosphatidylmonomethylethanolamine (PMME)
- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(CH<sub>3</sub>) : phosphatidylmethylethanolamine (PDME)

ภาพที่ 2.3 สูตรทั่วไปของฟอสโฟลิพิดชนิดต่างๆ

ที่มา : Ratledge และ Tan (1990)

### 2.3.3 สฟิงโกลิพิด (sphingolipid)

สฟิงโกลิพิดเป็นลิพิดที่มีสายยาว มาจากการรวมตัวของสฟิงโกซายน์ (sphingosine) กับกรดไขมันด้วยพันธะเอไมด์ รวมเรียกว่า เซราไมด์ (ceramide) มีหมู่ฟอสเฟต (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) และไนโตรเจนเบส (nitrogen base) เช่น โคลิน ทำให้บริเวณนี้เป็นส่วนที่ละลายน้ำ สฟิงโกลิพิดเป็นองค์ประกอบในเยื่อหุ้ม และมีบทบาทในการจดจำระหว่างเซลล์ แบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามลักษณะการจับกับหมู่ที่มีขั้วต่างๆ (a polar head group) คือ สฟิงโกไมอีลิน (sphingomyelin) เซเรโบรไซด์ (cerebrosides) และแองกลิโอไซด์ (gangliosides) สำหรับยีสต์จะพบเฉพาะเซเรโบรไซด์ และส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์ของไฟโตสฟิงโกซีน (phytospingosine) และไดไฮโดรสฟิงโกซีน (dihydrosphingosine) (Ratledge และ Tan, 1990)

### 2.3.4 สเตียรอยด์ (steroid compound)

สเตียรอยด์เป็นอนุพันธ์ของไซโคลเพนตาโนไฮโดรฟีแนนทริน สเตียรอยด์ในยีสต์พบทั้งในรูปอิสระและในรูปเอสเทอร์ประมาณร้อยละ 0.1-1 ของลิพิดทั้งหมดในยีสต์ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสเตอรอล คือ เออโกสเตอรอล (ergosterol) และไซโมสเตอรอล (zymosterol) (Ratledge และ Tan, 1990)

สารในกลุ่มสเตอรอลจัดเป็นองค์ประกอบที่พบในเยื่อหุ้มพลาสมามากถึงร้อยละ 80 มีหน้าที่หลักคือควบคุมการไหลและการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้ม และกระบวนการต่าง ๆ ในเยื่อหุ้ม

เซลล์ สเตอรอลยังควบคุมการเคลื่อนที่ของสารเอซิดของฟอสโฟลิพิด ทำให้เยื่อหุ้มพลาสมามีความหนา และมีส่วนเกี่ยวข้องต่อชนิดของกรดไขมันและโปรตีนของฟอสโฟลิพิด การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสเตอรอลมีผลทำให้ยีสต์ไวต่อยาสชนิดต่าง ๆ และยังมีส่วนในการควบคุมลักษณะทางกายภาพ จากงานวิจัยของ Sharma (2006) พบว่าสเตอรอลจะมีผลต่อการปรับตัวและการตอบสนองของยีสต์ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันและการไหลของของเหลวภายในเซลล์ แต่จะไม่เกี่ยวข้องกับการจัดเรียงตัวของฟอสโฟลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์

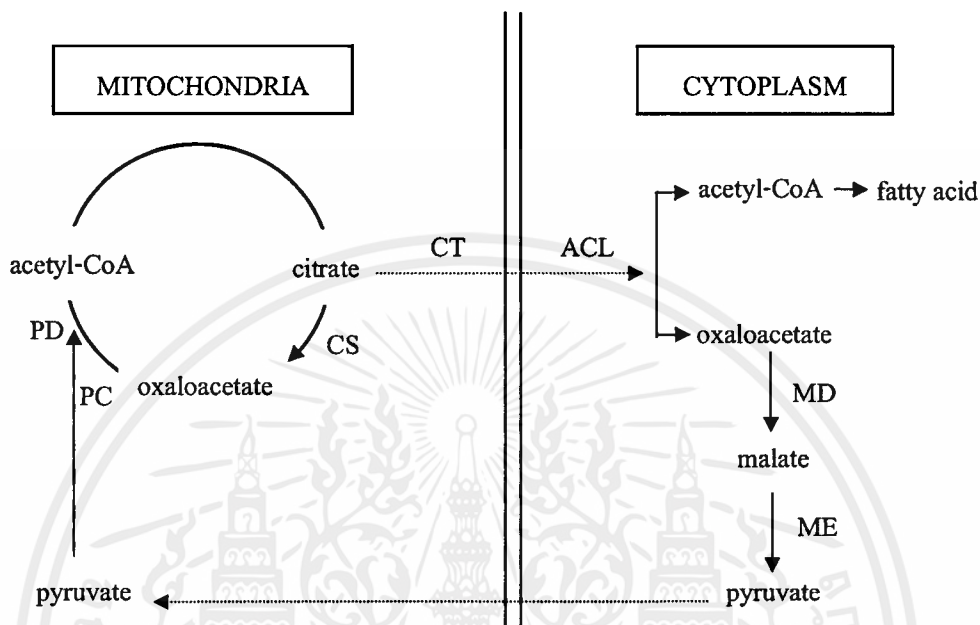
## 2.4 การผลิตลิพิดของยีสต์

การสะสมลิพิดในจุลินทรีย์น้ำมัน เริ่มจากการที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารอาหารมากเกินไปอย่างเช่นสภาวะที่มีไนโตรเจนปกติ แต่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป ซึ่งคาร์บอนจะอยู่ในรูปของกลูโคส เมื่อในอาหารมีปริมาณกลูโคสอย่างต่อเนื่อง ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนคาร์บอนเป็นไตรกลีเซอรอล ขณะที่การสะสมลิพิดจะเริ่มเมื่อเซลล์มีอัตราการเจริญคงที่ อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด จะทำให้เซลล์มีการเจริญลดลงขณะที่การฟอर्मลิพิดภายในเซลล์ (lipid content) จะเกิดขณะที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่

เมื่อปริมาณไนโตรเจนน้อยลง จะกระตุ้นการทำงานของ เอนไซม์ adenosine mono-phosphate deaminase (AMP deaminase) โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะทำให้เกิดแอมโมเนียมอิสระ และเมื่อปริมาณไนโตรเจนหมดลงจะทำให้ความเข้มข้นของ AMP ภายในเซลล์ลดลง ควบคู่กับความต้องการออกซิเจนและปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase (ICDH) ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียหยุดทำงาน หรือมีกิจกรรมต่ำ ส่งผลให้มีการสะสมซิเตรท จากนั้นโมเลกุลของซิเตรทจะถูกขนส่งผ่านออกนอกไมโทคอนเดรีย ส่วนของไซโตพลาสซึมในรูปของออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) โดยมีเอนไซม์ซิเตรทไลเอส (citrate lyase: ACL) ซึ่งพบเฉพาะในจุลินทรีย์น้ำมัน ทำหน้าที่เปลี่ยนซิเตรทให้เป็นออกซาโลอะซิเตท และอะซิติลโคเอ หลังจากนั้นออกซาโลอะซิเตทจะถูกเปลี่ยนเป็นมาเลต (malate) โดยเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase, MD) (ภาพที่ 2.4) ACL จะมีความเกี่ยวข้องกับการสะสมลิพิดของยีสต์ ราและจุลินทรีย์น้ำมันชนิดอื่น โดยมักจะพบ ACL ก่อนจะเริ่มมีการสะสมลิพิด แต่ในกระบวนการยีสต์ขยายกรดไขมัน จะไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ ACL แต่ ACL จะเป็นตัวกำหนดการสะสมลิพิด ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่นจะเป็นตัวควบคุมการยีสต์ขยายและการสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์ (Ratledge, 2002; Lederberg, 1992)

การสังเคราะห์กรดไขมันจะเกิดในไซโตพลาสซึม ซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ fatty acid synthetase complex (FAS) โดยจะใช้พลังงานในการเปลี่ยนอะซิติลโคเอเป็นมาโลนิลโคเอ จากนั้นอะซิติลโคเอและมาโลนิลโคเอจะทำปฏิกิริยากับ acyl carrier protein (ACP) กลายเป็น acetyl-ACP และ malonyl-ACP ซึ่งจะรวมตัวกันได้เป็น acyl ACP ( $C_n$ ) จากนั้นปฏิกิริยาจะเกิดซ้ำ

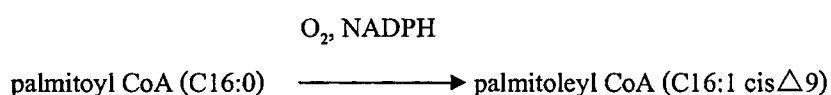
เดิมคือ มีการเติมคาร์บอนทีละ 2 อะตอมไปเรื่อยๆ จนได้เป็นกรดไขมันสายยาว (Picataggio และคณะ, 2007)



ภาพที่ 2.4 กลไกการสังเคราะห์ลิพิดของยีสต์และรา PD: pyruvate dehydrogenase; PC: pyruvate carboxylase; CS: citrate synthetase; CT: citrate translocase; ACL: citrate lyase; MD: malate dehydrogenase และ ME: malic acid

ที่มา : คัดแปลงจาก Lederberg (1992)

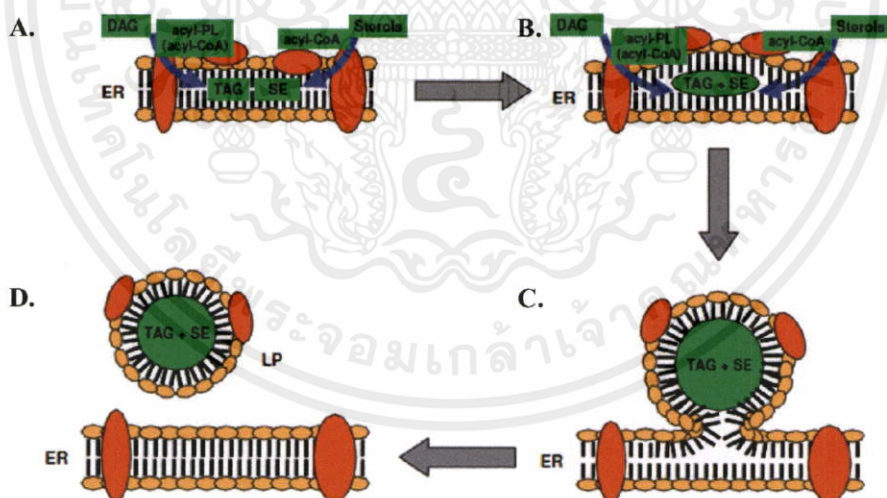
ในการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีคาร์บอนมากกว่า 16 อะตอมจะอาศัย microsomal chain elongation system ซึ่งพบในเยื่อหุ้มเรติคูลัม นอกจากนี้ chain elongation อาจเกิดในไมโทคอนเดรีย fatty acyl CoA จะรวมตัวกับเอซิลโคเอ และมีการสร้างพันธะคู่โดยใช้ออกซิเจน และ reduce nicotinamide coenzyme และ electron transport system เรียกระบบนี้ว่า microsomal desaturase system (Picataggio และคณะ, 2007)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ จากปฏิกิริยา 2 ชนิดคือ desaturation และ elongation ทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ ได้แก่ การสังเคราะห์ กรดแกมมาลิโนเลอิก (GLA) จากกรดลิโนเลอิก (LA)

กรดสเตียโรนิก (stearidonic acid, STA) จากกรดแอลฟาไลโนเลอิก ( $\alpha$ -linoleic acid, ALA) กรด ไดโฮโมแกมมาลิโนเลอิก (dihomo- $\gamma$ -Linoleic, DGLA) จาก GLA ไอโคซาเตตระอีโนอิก (eicosatetraenoic acid, ETA) จาก STA ETA จาก DGLA และ EPA จาก ARA ซึ่งมีรายงานว่ายีสต์ *Yarrowia sp.* มีการสังเคราะห์ ARA และ EPA (Picataggio และคณะ, 2007)

ในการสังเคราะห์กรดไขมันในกลุ่มโอเมกา 6 จะมีกรดไขมันอิ่มตัวสายยาวเป็นสารตั้งต้นในการผลิต เช่น กรดโอเลอิก กรดสเตียริก เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาโดยกรดโอเลอิกจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดลิโนเลอิก (LA) โดยเอนไซม์  $\Delta 12$  desaturase จากนั้นจะมีการใช้เอนไซม์  $\Delta 9$  elongase และ  $\Delta 8$  desaturase เปลี่ยนสับสเตรท LA เป็นโอเมกา 6 ชนิดต่างๆ นอกจากนี้เอนไซม์  $\Delta 9$  elongase และ  $\Delta 8$  desaturase ยังสามารถใช้กรดแอลฟาไลโนเลอิกเป็นสับสเตรท เพื่อผลิตโอเมกา 3 เมื่อเซลล์มีการผลิตกรดไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์และอนุพันธ์ของลิพิดในกลุ่มสเตียรอล เอสเทอร์เป็นจำนวนมาก จะทำให้เกิดการก่อตัวเป็นเม็ดลิพิด โดยเม็ดลิพิดที่พบภายในเซลล์มีลักษณะกลม ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ สเตียรอลเอสเทอร์เป็นส่วนใหญ่ และสะสมบริเวณชั้นของเยื่อหุ้มเรติคูลัม เมื่อเกิดการสะสมเป็นจำนวนมากจะทำให้เม็ดลิพิดมีขนาดใหญ่ และแยกออกจากชั้นของเยื่อหุ้ม เข้าสู่ไซโตพลาสซึม ดังภาพที่ 2.5 (Athenstaedt และ Daum, 2006; Picataggio และคณะ, 2007; Czabany และคณะ, 2008)



ภาพที่ 2.5 โมเดลการสังเคราะห์เม็ดลิพิด เมื่อ (A) การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (TAG) และสเตียรอลเอสเทอร์ (SE) โดยเอนไซม์บริเวณเยื่อหุ้มเรติคูลัม (ER) ซึ่งการสังเคราะห์ TAG จะมี acyl-PL และ ไดเอซิลกลีเซอรอล (DAG) เป็นองค์ประกอบ ขณะที่การสังเคราะห์ SE จะใช้สเตอรอลและ acyl-coA (B) เกิดการสะสมของ TAG และ SE ในส่วนของชั้นฟอสโฟลิพิดบริเวณเยื่อหุ้ม ER (C) เริ่มมีการฟอร์มเป็นเม็ดลิพิด (D) เกิดการแยกตัวอย่างสมบูรณ์ เมื่อ PL คือฟอสโฟลิพิด และ LP คือเม็ดลิพิด

ที่มา: Athenstaedt และ Daum (2006)

## 2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตลิพิดจากยีสต์

การผลิตน้ำมันจากยีสต์จะเกิดเมื่อยีสต์อยู่ในสภาพที่มีความกดดันสูง เช่น ในสภาพที่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ เป็นต้น ยีสต์จึงเริ่มมีการเปลี่ยนคาร์บอนเป็นลิพิด และเพื่อให้ยีสต์มีการผลิตที่เหมาะสม จึงต้องควบคุมปัจจัยและสภาวะที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสม ปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน พีเอช อุณหภูมิ เป็นต้น

### 2.5.1 อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน

2.5.1.1 แหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี ได้แก่ น้ำตาล เช่น กลูโคส เฮกโซส ไชโลส มอลโทส หรือซูโครส เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์จะสามารถนำไปเป็นสับสเตรทตั้งต้นเพื่อสร้างพลังงานและสะสมลิพิด นอกจากนี้ จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถย่อยอนุพันธ์ของโพลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้ง หรืออาจเป็นสารในกลุ่มกลีเซอรอลก็ได้ Shimizu และคณะ (1988) ได้ศึกษาความสามารถในการผลิต EPA ในรา *Mortierella alpine* 20-17 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *M. alpine* 20-17 สามารถผลิต EPA ได้ถึง 29 มิลลิกรัมต่อเซลล์แห้ง เมื่อทำการบ่มที่ 12 องศาเซลเซียส ขณะที่ Grandhi และ Weete (1991) พบว่าเมื่อเลี้ยงรา *Pythium uftimum* 144 ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน พบการผลิต EPA และ ARA ได้ 133 และ 138 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.5.1.2 แหล่งไนโตรเจน แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ได้แก่ แอสพาราจีน กลูตามิก ยีสต์สกัด และเปปโตน รวมไปถึงแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้แก่ แอมโมเนียหรือยูเรีย ส่วนใหญ่มักเติมในปริมาณน้อย คือประมาณ 0.005-1 โดยน้ำหนัก เนื่องจากยีสต์จะสะสมลิพิดในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด Evans และ Ratledge (1984) ได้ศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสะสมลิพิดของยีสต์ทั้งหมด 17 สายพันธุ์ พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์จะช่วยทำให้ยีสต์มีการผลิตลิพิดสูงขึ้น โดยเฉพาะยีสต์ *Rs. toruloides* CBS 14 ซึ่งจะมีลิพิดสะสมเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์ เมื่อใช้กลูตามิก ยูเรียหรืออาร์จินีนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการใช้ กลูตามิกจะไม่ทำให้ปริมาณลิพิดเพิ่มสูงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง แต่การสะสมลิพิดจะเกิดได้ดีในสภาวะการเลี้ยงแบบแบช ซึ่งกลไกการสะสมลิพิดนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับปริมาณแอมโมเนียมอิสระและปริมาณซีเตรทภายในเซลล์ ขณะที่ Kraisintu และคณะ (2010) ได้คัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ใหม่ *Rs. toruloides* DMKU3-TK16 ซึ่งสามารถผลิตลิพิดได้สูงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด โดยยีสต์สามารถผลิตลิพิดได้สูงที่สุด เมื่อเลี้ยงในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 0.75 กรัมต่อลิตร  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.55 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4 กรัมต่อลิตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.0 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.5 โดยมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 140 ที่สภาวะดังกล่าวจะทำให้ยีสต์ *Rs. toruloides* DMKU3-TK16

ผลิตลิวินได้ถึง 9.26 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 71.30 ของน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด (13.33 กรัมต่อลิตร) หลังเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันที่ได้จากยีสต์กับกรดไขมันในน้ำมันพืชชนิดอื่น พบว่ามีองค์ประกอบใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันที่ผลิตโดย *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16 กับน้ำมันพืชชนิดอื่น ๆ

	ชนิดกรดไขมัน (%w/w)						
	14:0 <sup>a</sup>	16:0 <sup>b</sup>	16:1 <sup>c</sup>	18:0 <sup>d</sup>	18:1 <sup>e</sup>	18:2 <sup>f</sup>	18:3 <sup>g</sup>
<i>Rs. toruloides</i> DMKU3-TK16	0.96	22.49	0.82	14.56	41.54	15.12	4.51
น้ำมันถั่วเหลือง	nd	12	nd	3	23	56	6
น้ำมันปาล์ม	nd	43	nd	5	41	10	nd
น้ำมันเมล็ดคอตตอน	nd	20	nd	3	19	55	nd
น้ำมันข้าวโพด	nd	12	nd	2	25	61	nd
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	nd	6	nd	3	17	74	nd

หมายเหตุ : <sup>a</sup>Myristic acid 14:0, <sup>b</sup>Palmitic acid 16:0, <sup>c</sup>Palmitoleic acid 16:1, <sup>d</sup>Stearic acid 18:0, <sup>e</sup>Oleic acid 18:1, <sup>f</sup>Linoleic acid 18:2 <sup>g</sup>Linolenic acid 18:3 และ nd คือไม่มีข้อมูล  
ที่มา : Kraisintu และคณะ (2010)

### 2.5.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ถือเป็นปัจจัยรองลงมาจากสารอาหาร โดยอุณหภูมิที่ใช้จะมีผลกระทบต่อจำนวนคาร์บอนอะตอมและปริมาณความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ ส่วนมากจะอยู่ในช่วง 24-40 องศาเซลเซียส Quoc และ Dubacq (1997) พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการสังเคราะห์สารในกลุ่มลิวินของไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์กรดไขมันคือ 24 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการสังเคราะห์กรดแกมมาลิโนเลนิกเพิ่มสูงขึ้น ขณะที่ Converti และคณะ (2009) ได้ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิและปริมาณไนโตรเจนต่อการผลิตและสะสมลิวินของสาหร่าย *Nannochloropsis oculata* และ *Chlorella vulgaris* เพื่อผลิตไบโอดีเซล พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 20 เป็น 25 องศาเซลเซียส จะทำให้ *N. oculata* มีการสะสมลิวินเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 7.90 เป็น 14.92 ตามลำดับ ขณะที่ *C. vulgaris* จะมีการสะสมลิวินลดลง

### 2.5.3 ค่าพีเอช

ค่าพีเอชจะมีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยทั้งต่อปริมาณและชนิดของกรดไขมัน ส่วนใหญ่ค่าพีเอชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์จะอยู่ในช่วง 5.4-8.5 จากงานวิจัยของ Johnson และคณะ (1992) ได้ศึกษาถึง

ผลของพีเอชต่อการสะสมลิพิดของยีสต์ *R. glutinis* IIP-30 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแบบที่มีการเติมอาหาร (fed batch) ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 4.0 จะทำให้ *R. glutinis* สามารถผลิตลิพิดได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 66 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่พีเอชเท่ากับ 3, 5 และ 6 จะมีปริมาณลิพิดทั้งหมดร้อยละ 12, 48 และ 44 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของกรดไขมัน พบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

#### 2.5.4 ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนมีผลกระทบต่อการเจริญและการเพิ่มปริมาณของเซลล์ เนื่องจากออกซิเจนเป็นปัจจัยที่ช่วยในการขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะสารในกลุ่มโปรตีน แต่ในการผลิตลิพิดของยีสต์จะมีความต้องการออกซิเจนในปริมาณต่ำ เนื่องจากการสังเคราะห์ลิพิดจากปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์ไม่มีความต้องการออกซิเจน (Rintala, 2010) จากการศึกษาของ Yen และ Zhang (2011) ถึงผลของปริมาณออกซิเจนต่อการผลิตลิพิดของยีสต์ *R. glutinis* เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล พบว่าปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการสะสมลิพิดของยีสต์ โดยภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ จะทำให้เซลล์มีการเจริญช้าลง ขณะที่การสะสมลิพิดจะเพิ่มขึ้น เมื่อทดลองในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร มีปริมาณออกซิเจนละลายร้อยละ  $25 \pm 10$  ที่เพาะเลี้ยงแบบแบช จะให้ปริมาณน้ำมันมากกว่าสภาวะที่มีออกซิเจนละลายสูง (ร้อยละ  $60 \pm 10$ ) นอกจากนี้ระดับออกซิเจนยังไม่มีผลต่อปริมาณกรดไขมัน

#### 2.6 การใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต จึงได้มีการใช้วัตถุดิบราคาถูกมาทดแทน อ้อยถือเป็นวัตถุดิบราคาถูกที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทย มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 6.0 ล้านไร่ อ้อยถือเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตน้ำตาลทรายซึ่งมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารแทบทุกชนิดในประเทศไทยมีการบริโภคน้ำตาลประมาณปีละ 1.6-1.7 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 17,000-19,000 ล้านบาท นอกจากนี้อ้อยยังมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมพลังงาน โดยเฉพาะการผลิตเอทานอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่เกิดจากการหมักพืช เศษซากพืช ได้แก่ อ้อย น้ำตาล กากน้ำตาล กากอ้อย บีทรูท (หัวผักกาดหวาน) แป้ง มันสำปะหลัง มันเทศ รวมถึงธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง เพื่อเปลี่ยนแป้งจากพืชให้เป็นน้ำตาล และเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ โดยแอลกอฮอล์ที่ทำให้บริสุทธิ์ร้อยละ 95 จะเรียกว่า เอทานอล (ethanol) (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2553) การใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบจึงน่าจะช่วยลดต้นทุนการผลิตและเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าของสินค้าการเกษตร เนื่องจากน้ำอ้อยมีองค์ประกอบของน้ำตาลจำนวนมาก (Wolford, 1996) ดังตารางที่ 2.3 จึงเหมาะต่อการใช้เป็นแหล่งอาหารของยีสต์ อีกทั้งยังมีสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์และแร่ธาตุชนิดอื่นที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญของยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้

### ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของน้ำอ้อย

องค์ประกอบ	ร้อยละ
น้ำ	75-88
ซูโครส	10-21
น้ำตาลรีดิวิซ์	0.3-3.0
สารอินทรีย์	0.5-0.1
สารอนินทรีย์	0.2-0.6

ที่มา: Bhattacharya และคณะ (2001)

Sabry และคณะ (1990) ศึกษาการใช้กากน้ำตาลจากหัวบีทเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ *R. glutinis* ซึ่งจัดเป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตลิพิด และสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นลิพิดได้ถึงร้อยละ 7 นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์สามารถเก็บลิพิดได้สูงสุดถึงร้อยละ 24.1 หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ในอาหารที่ประกอบด้วย  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  3 กรัมต่อลิตร  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.7 กรัมต่อลิตร  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.1 กรัมต่อลิตร  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.05 กรัมต่อลิตร  $\text{FeCl}_3$  0.05 กรัมต่อลิตร และกากน้ำตาลจากหัวบีทที่ป็นเหวียงแล้ว 60 กรัมต่อลิตร (พีเอช 7.0) ขณะที่ Alvarez และคณะ (1992) ได้ศึกษาการสะสมลิพิดของยีสต์ *R. glutinis* ในกากน้ำตาลจากอ้อยโดยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงในกากน้ำตาลจากอ้อยภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จะส่งผลต่ออัตราการเจริญและองค์ประกอบของกรดไขมัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ยีสต์จะมีอัตราการเจริญลดลง แต่มีน้ำหนักเซลล์ ปริมาณลิพิดภายในเซลล์และปริมาณลิพิดทั้งหมดเพิ่มขึ้น โดยปริมาณลิพิดสูงสุดที่เซลล์สามารถผลิตได้คือร้อยละ 39 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมันคือ ปริมาณ โอเลอิกลดลงเช่นเดียวกับการเจริญ ขณะที่ปริมาณสเตียริกเพิ่มขึ้น

จากการทดลองของ Karatay และ Domez (2010) ที่ได้พยายามปรับปรุงการเลี้ยงยีสต์เพื่อให้สะสมลิพิดทดแทนไบโอดีเซล โดยใช้กากน้ำตาล พบว่าจากการทดลองเลี้ยงยีสต์ทั้งหมด 3 สายพันธุ์คือ *Candida lipolytica*, *C. tropicalis* และ *R. mucilaginosa* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 8 และปริมาณ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.0 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วันพบว่ายีสต์ทั้งสามชนิดมีการสะสมลิพิดและปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดดังนี้ *C. lipolytica* มีการสะสมร้อยละ 59.9 และ 84.9 *C. tropicalis* มีการสะสมร้อยละ 46.8 และ 93.2 ขณะที่ *R. mucilaginosa* มีการสะสมร้อยละ 69.5 และ 93.2 โดยปริมาณกรดไขมันส่วนใหญ่อยู่ในช่วง

$\text{C}_{16}$ - $\text{C}_{18}$  ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมไบโอดีเซลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้กากน้ำตาลจากอ้อยยังถูกใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ผลิตน้ำมัน โดยได้ศึกษาถึงการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acids, PUFA) จากรา *Mucor recurvus* โดยใช้กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยอุดมไปด้วยสารอาหารและวิตามิน ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนจากรา *M. recurvus* ได้ และพบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลจากอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 15 ความคุมอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 35 พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 วัน จะทำให้รามีการสะสมลิพิดถึง 7.13 กรัมต่อลิตรและมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน 5.74 กรัมต่อลิตร (Li และคณะ, 2008)

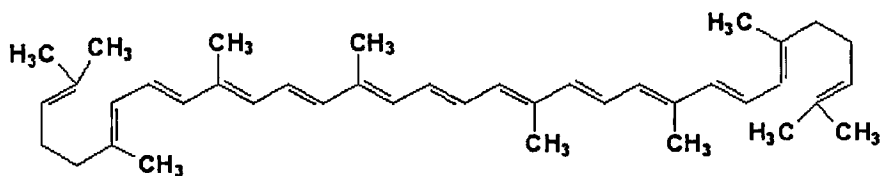
## 2.7 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เป็นกลุ่มของรงควัตถุที่พบในพืช ให้สีเหลือง ส้ม และแดง มีสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ แคโรทีนอยด์ชนิดที่ถูกสังเคราะห์มากที่สุด คือ ฟิวโคแซนทิน (fucoxanthin) โดยสาหร่ายชนิดต่างๆ และอีก 3 ชนิดคือ ลูเทอิน (lutein) ไวโอลาแซนทิน (violaxanthin) และนีโอแซนทิน (neoxanthin) แคโรทีนอยด์ที่ถูกสังเคราะห์โดยพืชใบเขียวจะถูกพบรองลงมาคือ แคโรทีน (carotene) และซีแซนทิน (zexanthin) สำหรับแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น เช่น ไลโคพีนพบมากในมะเขือเทศ และแคพแซนทิน พบมากในพริกแดง (นิริยา รัตนาปนนท์, 2549) แคโรทีนอยด์แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

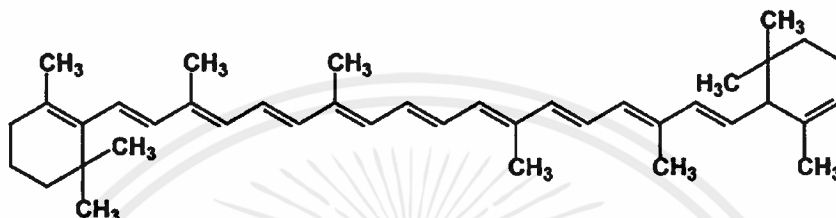
2.7.1 กลุ่มที่เป็นไฮโดรคาร์บอน คือแคโรทีนซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์กลุ่มที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีนซึ่งเป็นไดเอิน (diene) ( $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) มาเรียงต่อกัน 8 หน่วย มีคาร์บอนทั้งหมด 40 อะตอม มีสูตร  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$  แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่มคือ

1. acyclic คือไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีวงแหวนอยู่ในโมเลกุล เช่น ไลโคพีน (ภาพที่ 2.6)
2. monocyclic คือไฮโดรคาร์บอนที่มีวงแหวนอยู่ในโมเลกุลที่ปลายด้านหนึ่ง เช่น แกมมา-แคโรทีน ทำให้โครงสร้างครึ่งหนึ่งของโมเลกุลแกมมา-แคโรทีนเหมือนกับไลโคพีนและอีกครึ่งหนึ่งเหมือนกับบีตา-แคโรทีน (ภาพที่ 2.6)
3. bicyclic คือไฮโดรคาร์บอนที่มีวงแหวนอยู่ในโมเลกุลที่ปลายทั้งสองด้าน เช่น แอลฟา-และบีตา-แคโรทีน โดยแอลฟา-แคโรทีนต่างจากบีตา-แคโรทีนที่ตำแหน่งพันธะคู่ของวงแหวนที่ 2

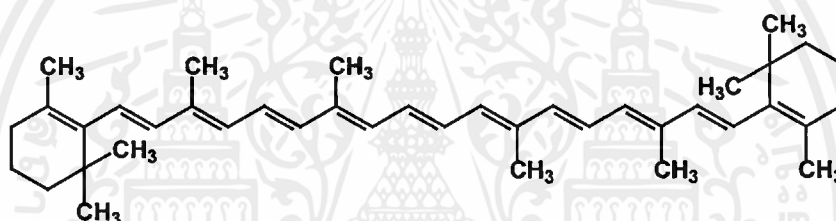
2.7.2 กลุ่มที่มีออกซิเจนในโมเลกุล คือกลุ่มของอนุพันธ์ไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล เมทอกซิล คาร์บอกซิล ีโต หรืออีพอกซี (epoxy) รวมเรียกว่า แซนโทฟิลล์ (xanthophylls) ส่วนใหญ่แคโรทีนอยด์กลุ่มนี้พบในพืชและมักจะอยู่ร่วมกับแคโรทีน เช่น คริปโตแซนทิน นอกจากนี้แซนโทฟิลล์ยังอาจอยู่ในรูปของอนุพันธ์เอสเทอร์กับกรดไขมัน เป็นรงควัตถุหลักที่พบในข้าวโพด พริกแดง มะละกอสุก และส้ม (นิริยา รัตนาปนนท์, 2549) อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



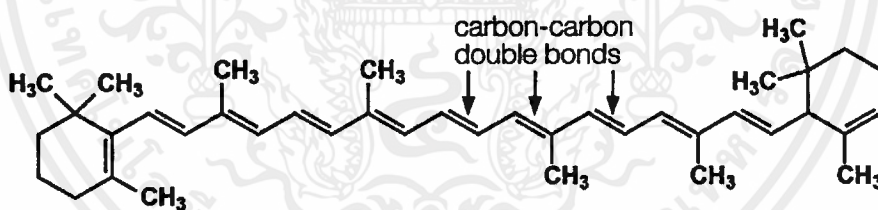
ไลโคพีน



แอลฟา-แคโรทีน



บีตา-แคโรทีน



แกมมา-แคโรทีน

ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของแคโรทีนชนิดต่าง ๆ

ที่มา : ดัดแปลงจากนิธิยา รัตนาปนนท์, 2549

แคโรทีนอยด์เป็นสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในเนื้อเยื่อ เช่น มะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ ช่วยลดการทำลายของเนื้อเยื่อ และโรคข้อกระดูก แคโรทีนอยด์ที่ใช้ในทางการค้าจะอยู่ในรูปของแป้ง หรือสารสกัดจากพืช โดยจะใช้เป็นสารเติมแต่งในการช่วยเพิ่มสีในอาหาร โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมน้ำผักผลไม้ อาหารกระป๋อง ไอศกรีม น้ำสลัด เป็นต้น ขณะที่ในทางเภสัชกรรมมีการผลิตแคโรทีนอยด์ในรูปของอาหารเสริม เพื่อช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรคต่าง ๆ นอกจากนี้แคโรทีนอยด์ยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิตวิตามินเอ ซึ่งมีประโยชน์ต่อ

ผิวหนัง และการซ่อมแซมเซลล์ ทำให้เซลล์ผิวหนังมีการเจริญเป็นปกติ ในปัจจุบันจึงมีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิต เนื่องจากการใช้พืชและสัตว์ต้องอาศัยสภาพแวดล้อม และการเปลี่ยนแปลงขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต แต่การผลิตจากจุลินทรีย์อาศัยเทคโนโลยีทางชีวภาพเป็นตัวควบคุม ทั้งประสิทธิภาพ และต้นทุนการผลิต (Maldonade และคณะ, 2008; Weeks, 2003)

จากการศึกษาของ Maldonade และคณะ (2008) ซึ่งได้ทำการสกัดแคโรทีนอยด์จากยีสต์ที่แยกได้จากประเทศบราซิล พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวจากมอลต์สกัด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน โดยปราศจากแสง พบการผลิตโทลูอินและบีตา-แคโรทีนในยีสต์สายพันธุ์ *R. glaminis*-125, *R. glutinis* และ *Sporobolomyces roseus* ขณะที่โทลูอินเป็นแคโรทีนอยด์หลักที่ผลิตโดย *R. mucilaginoso* เมื่อตรวจวัดปริมาณของแคโรทีนอยด์ พบว่า *R. glutinis* มีการผลิตแคโรทีนอยด์มากที่สุด (881  $\mu\text{g/l}$ ) ตามมาด้วย *R. glaminis* (594  $\mu\text{g/l}$ ), *R. mucilaginoso*-137 (590  $\mu\text{g/l}$ ), *R. mucilaginoso*-108 (562  $\mu\text{g/l}$ ) และ *R. mucilaginoso*-135 (545  $\mu\text{g/l}$ ) คล้ายกับงานวิจัยของ Taskina และ Erdalb (2011) ซึ่งได้ทำการศึกษาระดับแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จาก *Rhodotorula glutinis* MT-5 ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีน้ำทิ้งจากเมล็ดของผลโลควอทเป็นสับสเตรท ทำการเปรียบเทียบระหว่างน้ำทิ้งที่ปราศจากการกำจัดสารพิษและที่มีการกำจัดสารพิษออก พบว่า *R. glutinis* MT-5 มีการผลิตแคโรทีนอยด์เท่ากับ 62.73 mg/l และ 72.36 mg/l ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการผลิตแคโรทีนอยด์จากแบคทีเรียในตระกูล *Bacillus* sp. โดยพบว่า *B. marisflavi*, *B. indicus*, *B. firmus*, *B. altitudinis* และ *B. safensis* ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ สามารถผลิตสารในตระกูลแคโรทีนอยด์ได้ 3 ชนิด มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 455, 467 และ 492 นาโนเมตร ลักษณะของโคโลนีมีสีเหลือง ส้ม และชมพู ตามลำดับ โดย *Bacillus* sp. จะมีการผลิตแคโรทีนอยด์ภายในสปอร์ ทำให้ได้แคโรทีนอยด์ที่มีคุณสมบัติทนต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต (Khaneja และคณะ, 2009) ในขณะที่ในน้ำมันปาล์มดิบ (crude palm oil) และน้ำมันปาล์มแดง (red palm oil) พบปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูงถึง 670 และ 550 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และแคโรทีนอยด์จะถูกกำจัดออกหลังผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ (Berger, 2005)

## 2.8 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของลิพิดจากยีสต์น้ำมัน

สมบัติทางเคมีที่นิยมตรวจวิเคราะห์ในน้ำมันที่ใช้สำหรับบริโภคโดยทั่วไป จะมีการตรวจวัดเพื่อบ่งชี้คุณภาพของลิพิดหรือน้ำมัน ซึ่งได้แก่ ค่าไอโอดีน เลขซาฟอนนิฟิเคชัน ค่าเปอร์ออกไซด์ ค่าความเป็นกรด เป็นต้น (ตารางที่ 2.4)

ค่าไอโอดีนคือจำนวนกรัมของไอโอดีนที่ถูกดูดซับโดยลิพิดหรือน้ำมันจำนวน 100 กรัม ค่าไอโอดีนเป็นตัวบ่งชี้ชี้กริความไม่อิ่มตัว (degree of unsaturation) ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลของลิพิด โดยหากลิพิดมีพันธะคู่มาก ไอโอดีนก็จะถูกดูดซับมาก (Shahidi, 2005)

ตารางที่ 2.4 สมบัติทางเคมีของน้ำมันพืชที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ

ชนิดของน้ำมัน	SN <sup>a</sup>	IV <sup>b</sup>	PV <sup>c</sup>
น้ำมันข้าวโพด	187-195	103-128	10
น้ำมันงา	187-195	104-120	10
น้ำมันถั่วเหลือง	189-195	120-143	10
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	188-194	110-143	10
น้ำมันมะพร้าว	248-265	6.3-10.6	10
น้ำมันปาล์ม	190-209	50-55	10
น้ำมันรำข้าว	180-199	90-115	10

เมื่อ <sup>a</sup>SN คือเลขซาฟอนนิฟิเคชัน (มิลลิกรัม โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมลิพิด)

<sup>b</sup>IV คือค่าไอโอดีน (กรัมไอโอดีนต่อ 100 กรัมลิพิด)

<sup>c</sup>PV คือค่าเปอร์ออกไซด์ (มิลลิสมมูลต่อกิโลกรัมลิพิด)

ที่มา: Codex Standard for Named Animal Fats (1999)

เลขซาฟอนนิฟิเคชันคือจำนวนน้ำหนักของ โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นมิลลิกรัมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอย่างสมบูรณ์ของลิพิดหรือน้ำมันจำนวน 1 กรัม ให้เป็นกลางพอดี เลขซาฟอนนิฟิเคชันเป็นตัวบ่งชี้หรือบอกให้ทราบถึงขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุลของลิพิดหรือน้ำมัน ถ้ามีกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือขนาดของโมเลกุลเล็ก หรือมีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลน้อย จะใช้ต่างในการไฮโดรไลซิสมาก ทำให้เลขซาฟอนนิฟิเคชันสูง ในทางตรงกันข้ามถ้ามีกรดไขมันที่มีมวลโมเลกุลสูงหรือขนาดของโมเลกุลใหญ่ หรือมีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลมาก จะใช้ต่างในการไฮโดรไลซิสน้อยทำให้เลขซาฟอนนิฟิเคชันต่ำ (Shahidi, 2005)

ค่าเปอร์ออกไซด์หมายถึงจำนวนมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.002 โมลต่อลิตร ที่ใช้ในการไทเทรตลิพิด 1 กรัม เมื่อนำค่านี้มาคูณด้วย 2 จะได้ค่าเปอร์ออกไซด์ ซึ่งหมายถึงจำนวนมิลลิสมมูลของเปอร์ออกซิเจนต่อลิพิดหรือน้ำมัน 1 กิโลกรัม เป็นการวัดปริมาณเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่ในลิพิดซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด โดยการเปลี่ยนแปลงของค่าเปอร์ออกไซด์จะขึ้นกับการย่อยสลายของลิพิด และเป็นผลให้เกิดการฟอร์มตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์และกรดไขมันอิสระ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทในสัตว์ทดลอง หากมีปริมาณมาก

เกินกว่า 30 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม จึงมีการใช้ ค่า PV เป็นตัวชี้บอกปริมาณของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ในลิปิด (Gotoh และ Wada, 2006)

ค่าความเป็นกรดหมายถึงจำนวนมิลลิกรัมของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมันจำนวน 1 กรัมให้เป็นกลางพอดี ค่าของกรดเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณกรดไขมันอิสระแสดงว่าไตรกลีเซอไรด์ถูกทำลายให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระได้มากน้อยแค่ไหน (Shahidi, 2005)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

*Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

#### 3.2 วัตถุดิบ

น้ำอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

#### 3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง รุ่น Dragon 3002	(Mettler Ltd., Thailand)
เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 2215	(Diethelm, Singapore)
เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น Innova 2100	(New Brunswick Sci., USA)
เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น pH 522	(GS. Sicherheit, Germany)
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Rotofic 32A	(Bec Thai Co.Ltd., Thailand)
ตู้อบเชื้อ (Incubator) รุ่น Hanau UT6420	(Mettmert, Germany)
ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น Hanau T20	(Mettmert, Germany)
ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow) รุ่น HVB120S	(Boss tech., U.S.A.)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS325	(Tomy Seiko Co.Ltd., Japan)
กล้องจุลทรรศน์ (Microscopy) รุ่น CH32RF200	(Olympus Co.Ltd., Japan)
เครื่องผสม (Vortex mixer) รุ่น Genie-2	(Scientific In., U.S.A.)
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV1601	(Thermo electron Co., Japan)
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB-22	(Mettmert, Germany)
เครื่องอัลตราโซนิคเเตอร์ (Ultrasonicator) รุ่น VC750	(Sonic&Material Inc., USA)
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่นGC-HP 6890	(GMI Inc., USA)
ถังหมักแบบกวน (Stirred-tank fermentor) รุ่น Biostat B	(B. Braun, Germany)
อุปกรณ์เครื่องแก้ว	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

Ethanol ร้อยละ 95 (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	
Copper Sulfate Pentahydrate (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	(MerckGaA , Germany)
Sulfuric acid (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	(MerckGaA , Germany)
Sodium hydroxide (NaOH)	(MerckGaA , Germany)
Potassium hydroxide (KOH)	(MerckGaA , Germany)
Sodium thiosulfate (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	(MerckGaA , Germany)
Hydrochloric acid (HCl)	(MerckGaA , Germany)
Pyridine (C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N)	(MerckGaA , Germany)
Isooctane ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	(MerckGaA , Germany)
Acetone (CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> )	(MerckGaA , Germany)
Yeast extract	(Scharlau Chemie S.A., Spain)
Peptone	(Scharlau Chemie S.A., Spain)
Methylene blue	(MerckGaA , Germany)

### 3.5 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.6 วิธีดำเนินงาน

#### 3.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เชื้อเชื้อยีสต์ *Rs. toruloides* TISTR 5123 ลงในหลอดอาหาร Yeast malt (YM) agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อยีสต์จากหลอดอาหารแข็งลงในอาหารเหลว Yeast peptone dextrose (YPD) 300 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

#### 3.6.2 การเตรียมน้ำอ้อย

รับน้ำอ้อยคั้นสด พันธุ์สุพรรณบุรี 50 ปริมาตร 100 ลิตร มีความหวาน 16 บริกซ์ จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง บรรจุน้ำอ้อยสดลงในถังพลาสติกขนาด 50 ลิตร ปรับพีเอชของน้ำอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จนมีพีเอชเท่ากับ 2.0 เพื่อป้องกันการเสื่อมเสีย ปิดฝาให้สนิท และเก็บในห้องเย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เมื่อต้อง

นำมาใช้เตรียมอาหาร จะทำการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้น (ภาคผนวก ค) และปรับพีเอชให้เหมาะสมก่อนใช้ทุกครั้ง

**3.6.3 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตลิพิดของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน**

ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์สกัดกับเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน แปรผันอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) โดยเจือจางน้ำอ้อยให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้น 5 ระดับ คือร้อยละ 2.05, 5.09, 8.19, 12.28 และ 16.79 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้น เดิมยีสต์สกัดกับเปปโตเนให้มีอัตราส่วน C:N เป็น 60:1, 60:2, 60:3 และ 60:4 รวมทั้งหมด 20 สภาวะ และปรับพีเอชเป็น 5.6 ด้วย 1 N NaOH เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่สภาวะต่างๆ (ภาคผนวก ก) สภาวะละ 600 มิลลิลิตร โดยแบ่งบรรจุลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 2 พลาสติก พลาสติกละ 300 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เดิมกล้าเชื้อที่เตรียมในข้อ 3.6.1 (ปริมาณเซลล์  $1 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 30 มิลลิลิตร ต่อพลาสติก ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง วิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ และปริมาณลิพิดทั้งหมด ด้วยวิธี colorimetric method ตามวิธีของ Kwon และ Rhee (1986) (ภาคผนวก ค)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Complete Randomized Design) ในการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิพิดของยีสต์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทำการศึกษา 2 ปัจจัยคืออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (4 ระดับ) และความเข้มข้นของน้ำตาลอินเวิร์ท (5 ระดับ) วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 เปรียบเทียบปริมาณลิพิดและปริมาณเซลล์แห้งที่ยีสต์ผลิตได้ คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณลิพิดทั้งหมดไปศึกษาในข้อ 3.6.4 ต่อไป

**3.6.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตลิพิดและองค์ประกอบของลิพิดจากยีสต์**

**3.6.4.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตลิพิด**

นำสภาวะที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.3 มาทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 ระดับคือ 10, 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์อัตราการผลิตหลังเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 วันทุก ๆ 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าความขุ่น และคำนวณจำนวนเซลล์จากสมการกราฟมาตรฐานของปริมาณเซลล์ (ภาคผนวก ค) ทำการเก็บเซลล์เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ และปริมาณลิพิดทั้งหมด เมื่อเซลล์อยู่ในระยะสแตชันนารีคือเมื่อปริมาณเซลล์เริ่มคงที่ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดย

ทำการศึกษา 1 ปีจัดคืออุณหภูมิ (5 ระดับ) วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 17.0 คัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลผลิตโดยพิจารณาจากปริมาณผลิตทั้งหมดไปศึกษาในข้อ 3.6.5 ต่อไป

#### 3.6.4.2 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่ผลิตภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ เนื่องจากอุณหภูมิมิมีผลต่อการสังเคราะห์กรดไขมันภายในเซลล์ โดยเตรียมเมทธิลเอสเทอร์จากตัวอย่างเซลล์ประมาณ 350 มิลลิกรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลาย methanolic sodium hydroxide ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และใส่ boiling chip ต่อเข้ากับคอนเดนเซอร์ ทำการรีฟลักซ์จนไม่ปรากฏเห็นเม็ดผลิต (5-10 นาที) เติมโบรอนฟลูออไรด์ 7 มิลลิลิตร ผ่านคอนเดนเซอร์ แล้วต้มต่ออีก 1 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำเกลืออิ่มตัว 15 มิลลิลิตร ปิดจุก เขย่า 15 นาที จนอุ่นเติมน้ำเกลืออิ่มตัวเพื่อให้สารละลายเฮปแทนลอยขึ้นมาอยู่บนชั้นบน ปิดสารละลายเฮปแทนชั้นบนมา 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นจึงเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5-10 เพื่อไว้สำหรับวิเคราะห์โครมาโตกราฟี ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี สภาวะในการวิเคราะห์ใช้ตัวตรวจวัดชนิด flame ionization detector (FID) อุณหภูมิ injector 220 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตัวตรวจวัด 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้น 100 องศาเซลเซียส และเพิ่มอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสต่อนาที จนอุณหภูมิสุดท้ายเป็น 220 องศาเซลเซียส ใช้ไฮโดรเจนเป็นก๊าซตัวพา ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีด 1 ไมโครลิตร

#### 3.6.5 การศึกษาสมบัติทางเคมีของลิพิดที่ผลิตโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123

เลี้ยงยีสต์ตามสภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4 มาทำการเพาะเลี้ยง เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการสกัดลิพิดด้วยวิธี acid hydrolysis (AOAC 2000 ข้อ 35.1.23) โดยนำเซลล์เปียกของยีสต์ 5 กรัมเติมด้วย 4 N HCl 50 มิลลิลิตร กวนภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำเกลือที่มีเซลล์ยีสต์ใส่กรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างบีกเกอร์ด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมไดเอทิลอีเทอร์ 25 มิลลิลิตร เขย่า 100 ครั้ง (30 ครั้งแรกจะเกิดแก๊ส ให้ค่อยๆ ปลดปล่อยแก๊สออก) จากนั้นเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 25 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จะเกิดตะกอนแยกกับชั้นของลิพิด ไขส่วนตะกอนออกไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมส่วนของลิพิดทั้งหมดใส่ฟลาสก์ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอุ่นเพื่อให้สารระเหยออกและชั่งหาน้ำหนักของลิพิด เก็บตัวอย่างในรูปแบบลิพิดสกัดหยาบ (crude lipid) และวิเคราะห์สมบัติทางเคมีดังนี้ (ภาคผนวก ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 3.6.5.1 เลขชาวอนนิฟีเคชัน (AOAC 2000 ข้อ 41.1.18) บุญาคให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น 3.6.5.2 ค่าไอโอดีน (AOAC 2000 ข้อ 41.1.15) ถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.5.3 ค่าเปอร์ออกไซด์ (AOAC 2000 ข้อ 41.1.16)

### 3.6.5.4 ค่าความเป็นกรด (AOAC 2000 ข้อ 41.1.21)

### 3.6.6 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

วัดปริมาณแคโรทีนอยด์ใน 4 ตัวอย่างคือ เซลล์ทั้งหมด เซลล์ที่ผ่านการโซนิเคท (เซลล์สดที่ถูกทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator) กากเซลล์ และตัวอย่างลิพิดสกัดหยาบจากข้อ 3.6.4 (ภาคผนวก ค) การสกัดแคโรทีนอยด์จากเซลล์ ดัดแปลงจากวิธีของ Saenge และ Cheirsilp (2011) โดยนำตัวอย่าง 1 กรัมมาละลายในอะซิโตน 10 มิลลิลิตร เขย่าและแยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง เซลล์ที่แยกได้นำมาเติมอะซิโตน และสกัดซ้ำ จนเซลล์มีสีซีด จากนั้นนำอะซิโตนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 455 นาโนเมตร คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์จากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

### 3.6.7 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 แบบแบชในถังหมักแบบกวน ขนาด 5 ลิตร

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบกวน (stirred-tank fermentor) Biostat<sup>®</sup> B ขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4 เตรียมอาหารปริมาตร 3.5 ลิตร ปรับค่าพีเอชเริ่มต้น 5.6 อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที และออกซิเจนละลายร้อยละ 40-50 บันทึค่าพีเอช และเก็บตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทุก ๆ 48 ชั่วโมง นาน 192 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ และค่าความขุ่นของเซลล์ยีสต์ เพื่อติดตามผลของการขยายขนาดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมัก และคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ต่าง ๆ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate,  $\mu$ ) สัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ (Cell yield coefficient,  $Y_{X/S}$ ) ปริมาณผลผลิตต่อการใช้สับสเตรท (Process product yield,  $Y_{P/X}$ ) ปริมาณผลผลิตจำเพาะ (Specific yield of lipid,  $Y_{P/X}$ ) อัตราการใช้สับสเตรท (Volumetric rate of substrate consumption,  $Q_S$ ) อัตราการผลิตน้ำหนักแห้ง (Volumetric cell mass production rate,  $Q_X$ ) อัตราการผลิตลิพิด (Lipid production rate,  $Q_P$ ) อัตราการใช้สับสเตรทจำเพาะ (Specific rate of substrate consumption,  $q_S$ ) อัตราการผลิตลิพิดจำเพาะ (Specific rate of lipid production,  $q_P$ ) และค่าคงที่ของ โมโนด (Monod's constant,  $K_S$ ) (ภาคผนวก ค)

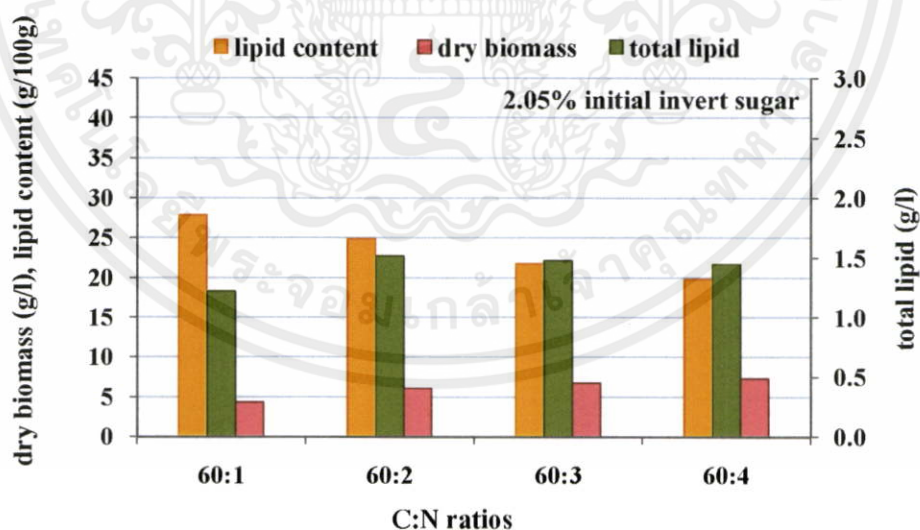
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลของปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตลิพิดของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 2.05 ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 144 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.1) พบว่ายีสต์มีการเจริญในอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ (60:4) ได้ดีกว่าอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง (60:1) โดยที่ 60:1 และ 60:4 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.38 และ 7.28 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณลิพิดภายในเซลล์ 27.81 และ 19.89 กรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 2.05 เมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงจะทำให้ยีสต์มีการสังเคราะห์ลิพิดภายในเซลล์สูงขึ้น ขณะที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ ยีสต์มีการเจริญมากขึ้น ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น



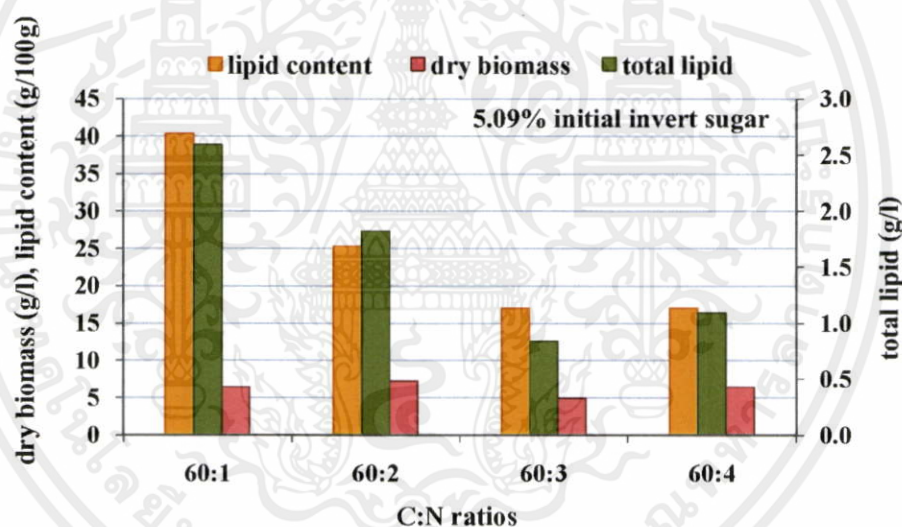
ภาพที่ 4.1 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท

เริ่มต้นร้อยละ 2.05 ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะ  
เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 144 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิพิดคือสภาวะที่มีปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งคือที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:2 มีปริมาณลิพิดทั้งหมด 1.51 กรัมต่อลิตร และการสะสมลิพิดมีแนวโน้มลดลงเมื่ออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ แต่จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของทั้ง 4 สภาวะกลับไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณลิพิดทั้งหมด ( $P>0.05$ ) ดังนั้นไม่ว่าจะใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ระดับใด จะได้ปริมาณลิพิดทั้งหมดใกล้เคียงกัน

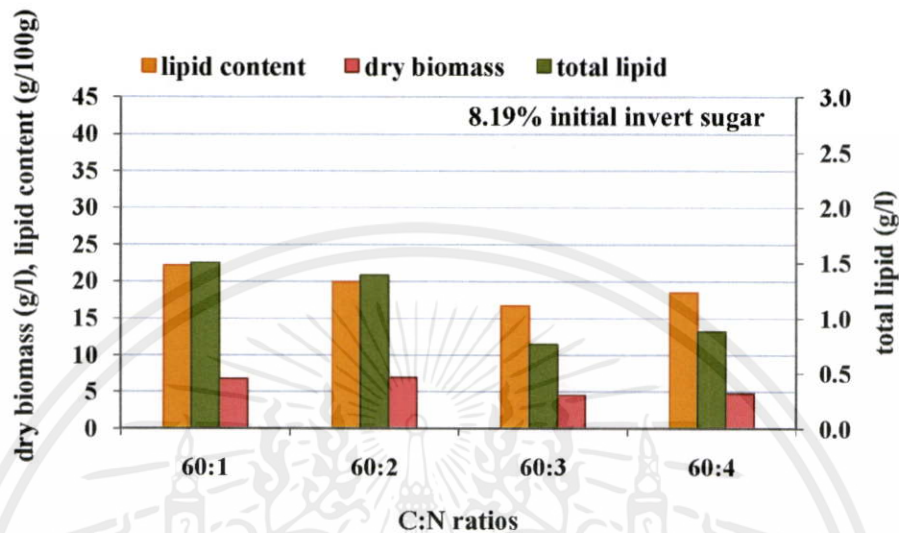
ขณะที่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นเป็นร้อยละ 5.09 พบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 ทำให้ยีสต์มีการผลิตลิพิดภายในเซลล์มากที่สุด (40.30 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง) และแตกต่างจากอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่น ๆ ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P\leq 0.05$ ) ขณะที่สภาวะดังกล่าวยังมีปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงที่สุดคือ 2.59 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณลิพิดทั้งหมดและลิพิดภายในเซลล์มีแนวโน้มลดลงเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 144 ชั่วโมง

ผลของการผลิตและสะสมลิพิดภายในเซลล์ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 8.19 แสดงในภาพที่ 4.3 โดยปริมาณลิพิดทั้งหมดและน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน เมื่อเลี้ยงภายใต้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 พบว่ายีสต์มีการสะสมลิพิดภายในเซลล์และปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงที่สุด 22.13 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งและ 1.50 กรัมต่อ

ลิตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) ของปริมาณลิตพิคทั้งหมดที่ระดับคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 และ 60:2

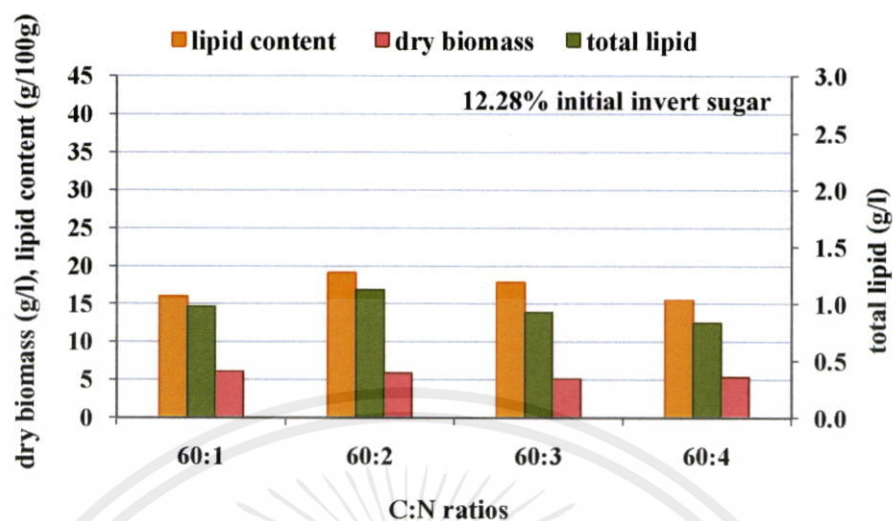


ภาพที่ 4.3 การผลิตลิตพิคโดยยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 8.19 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 144 ชั่วโมง

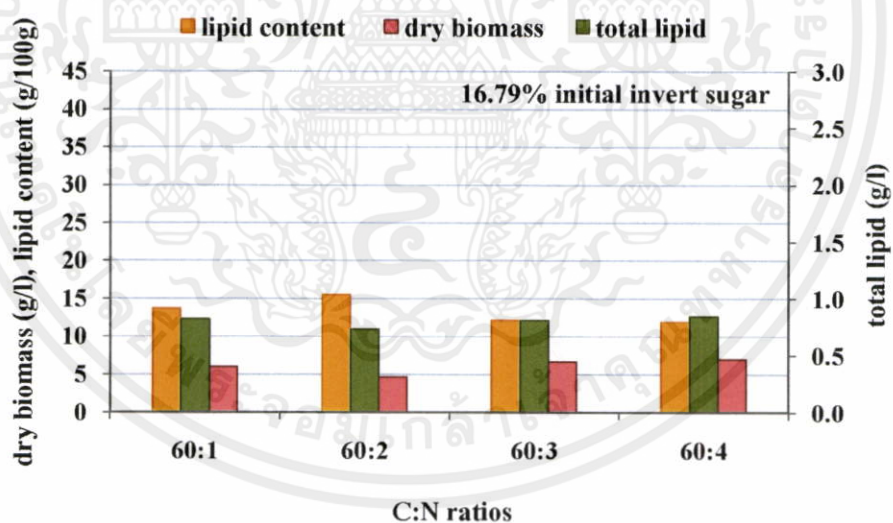
ภาพที่ 4.4 แสดงผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 12.28 พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ระดับต่าง ๆ มีผลต่อการสังเคราะห์ลิตพิคและการเจริญของยีสต์ ซึ่งจะทำให้ปริมาณลิตพิคภายในเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P\leq 0.05$ ) ขณะที่ปริมาณลิตพิคทั้งหมดมีปริมาณใกล้เคียงกันแสดงว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงขึ้น ทำให้การเจริญเพิ่มขึ้น แต่การสังเคราะห์ลิตพิคภายในเซลล์จะลดลง โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1, 60:2, 60:3 และ 60:4 มีปริมาณลิตพิคทั้งหมดเป็น 0.98, 1.12, 0.92 และ 0.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นสูงที่สุดคือร้อยละ 16.79 (น้ำอ้อยที่ไม่ได้เจือจาง) (ภาพที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนระดับต่าง ๆ มีปริมาณลิตพิคทั้งหมดใกล้เคียงกัน ปริมาณลิตพิคภายในเซลล์สูงที่สุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:2 (15.53 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) และเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลง ทำให้ปริมาณลิตพิคภายในเซลล์ลดลง แต่น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณลิตพิคทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการขงนึ่งเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่ผู้ใดที่นำหรือเผยแพร่ โยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 12.28 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 144 ชั่วโมง

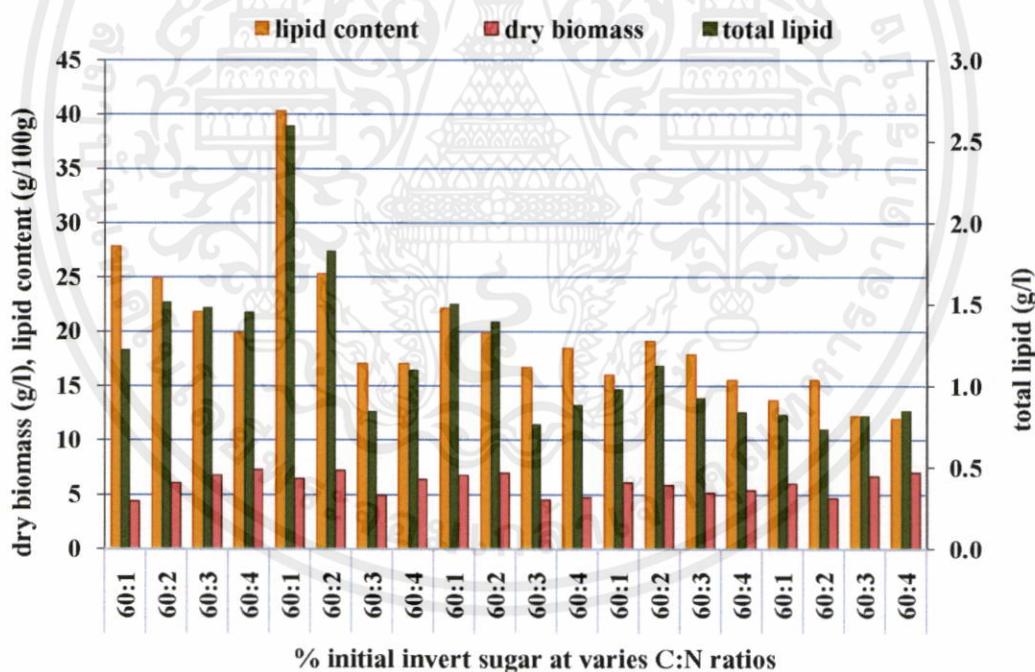


ภาพที่ 4.5 การผลิตลิพิดโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 16.79 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ ทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 144 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจากทั้งหมด 20 สภาวะที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นและ  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง ไม่สามารถนำ  
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ (ภาพที่ 4.6) พบว่า ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท

เริ่มต้นร้อยละ 5.09 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 ทำให้ยีสต์ *Rs. toruloides* TISTR 5123 มีปริมาณลิกพิดภายในเซลล์และลิกพิดทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าวทำให้ยีสต์มีการสะสมลิกพิดภายในเซลล์และปริมาณลิกพิดทั้งหมดสูงกว่าสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

จากการเปรียบเทียบปริมาณของลิกพิดและการเจริญที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทแตกต่างกันพบว่า เมื่อปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าร้อยละ 8.12 ยีสต์ยังคงมีการเจริญได้ตามปกติ แต่การผลิตลิกพิดภายในเซลล์มีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Liu และคณะ (2010) ที่พบว่าทั้งน้ำหนักเซลล์และปริมาณลิกพิดจะเพิ่มสูงขึ้นในอาหารที่มีการเพิ่มปริมาณกลูโคสเริ่มต้นตั้งแต่ 40 ถึง 60 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณลิกพิดและน้ำหนักเซลล์จะลดลงเมื่อมีปริมาณกลูโคสเป็น 80 และ 100 กรัมต่อลิตร โดย Karatay และ Donmez (2010) ได้อธิบายถึงการเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่มากเกินไป จะมีผลให้การสะสมลิกพิดลดลงเนื่องจากความเป็นพิษของกากน้ำตาลต่อการเจริญ จึงทำให้การสะสมลิกพิดลดลง



ภาพที่ 4.6 เปรียบเทียบการผลิตลิกพิดโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้น และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ เพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 144 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น เมื่อใช้อาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น จะทำให้ปริมาณลิกพิดมี

แนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น แต่น้ำหนักเซลล์แห้งกลับมีปริมาณต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ

Kraisintu และคณะ (2010) ที่พบว่าปริมาณลิพิทภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น แต่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนจะแปรผกผันกับน้ำหนักเซลล์ เนื่องจากเซลล์จะมีปริมาณลดลง ในอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากยีสต์จะเริ่มมีการสะสมลิพิทเมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจนซึ่งจะทำให้วัฏจักร TCA เกิดได้ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้มีการสะสมของซิเตรทภายในเซลล์ ยีสต์จึงต้องใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายโมเลกุลของซิเตรทและทำให้เกิดการสังเคราะห์โมเลกุลของลิพิท ขณะที่ในอาหารซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนใกล้เคียงกัน ส่งผลให้ยีสต์มีการสังเคราะห์พลังงานและเจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์ (Ratledge, 2004) เช่นเดียวกับ Le-ping และคณะ (2009) ที่อธิบายถึงลักษณะทางกายภาพของการสะสมลิพิทในยีสต์น้ำมันว่าการผลิตลิพิทจะเกิดได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมไปด้วยแหล่งของน้ำตาลหรือสารประกอบทดแทนเช่น กลีเซอรอลและพอลิแซ็กคาไรด์ แต่สารประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในอาหารควรมีปริมาณน้อย โดยเฉพาะปริมาณไนโตรเจน โดยเมื่อไนโตรเจนน้อย จะทำให้วัฏจักร TCA ถูกควบคุม ระบบการเมตาบอลิซึมเกิดการเปลี่ยนแปลง การสังเคราะห์โปรตีนหยุดทำงาน และทำให้เกิดการสังเคราะห์ลิพิท

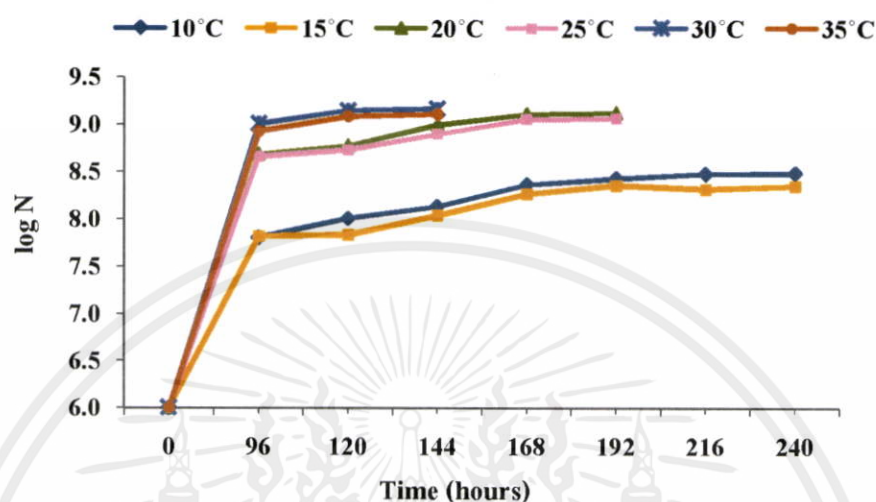
จากการพิจารณาปริมาณลิพิททั้งหมด จึงคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 ระดับของคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 มาทำการเพาะเลี้ยงในขั้นต่อไป

## 4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ การผลิตลิพิทและองค์ประกอบของลิพิทจากยีสต์

### 4.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการผลิตลิพิท

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิโดยทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rs. toruloides* TISTR 5123 ในอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 10, 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียสพบว่า อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งพิจารณาได้จากน้ำหนักเซลล์ โดยยีสต์จะมีการเจริญได้ดีตั้งแต่อุณหภูมิ 20 ถึง 35 องศาเซลเซียส จากการตรวจวัดอัตราการเจริญพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ยีสต์จะเข้าสู่ระยะสแตชันนารีในเวลา 144 ชั่วโมง ขณะที่เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง ทำให้ยีสต์ต้องใช้เวลาในการเข้าสู่ระยะดังกล่าวนานขึ้น ส่งผลให้ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน คือที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียสใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 192 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 10 และ 15 องศาเซลเซียสใช้เวลา 240 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.7) ซึ่งโดยปกติยีสต์จะมีการสร้างกรดไขมันในส่วนของฟอสโฟลิพิทในช่วงที่มีการเจริญสูงสุด (logarithmic phase) ขณะที่สารในกลุ่มลิพิทจัดเป็นสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งจัดเป็นสารที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญ และจะ

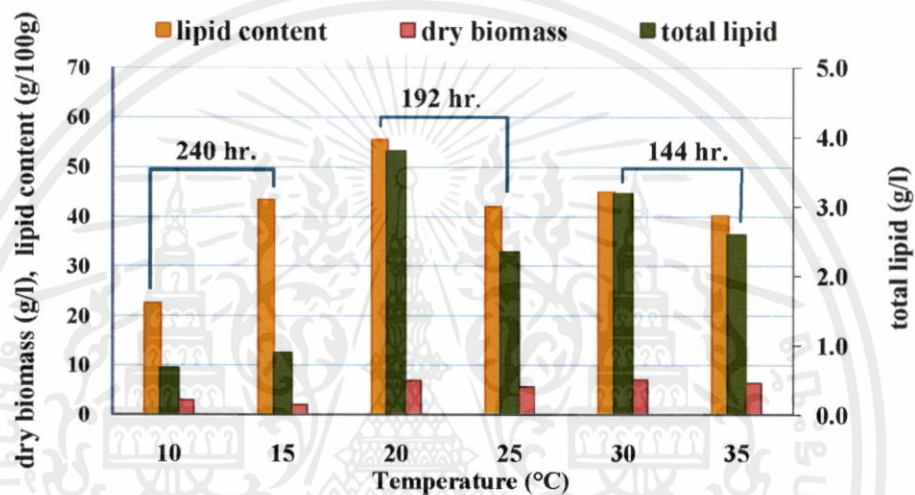
มีการสร้างหลังระยะการเจริญของเซลล์ ดังนั้นการสะสมลิพิดจึงเกิดได้ดีระหว่างระยะที่มีการเจริญ  
คงที่ (Rose และ Harrison, 1987)



ภาพที่ 4.7 การเจริญของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 เข้าสู่ระยะเสถียรในน้ำ  
ภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 ที่  
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

ในการวิเคราะห์ปริมาณของลิพิดที่ยีสต์ผลิตได้จึงจำเป็นต้องทำการเก็บเซลล์ในช่วงที่ยีสต์  
เข้าสู่ระยะที่มีการเจริญคงที่ โดยเมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสจะทำให้ยีสต์มีการเจริญ  
ต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็น 15 และ 10 องศาเซลเซียสพบว่ามี  
น้ำหนักแห้งเพียง 2.07 และ 2.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าอุณหภูมิอื่นอย่างมี  
นัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แม้ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสยีสต์จะยังมีการสะสมลิพิดภายใน  
เซลล์ได้ถึง 43.48 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง แต่เนื่องจากน้ำหนักเซลล์ที่น้อย จึงทำให้มีปริมาณ  
ลิพิดทั้งหมดต่ำลงตามไปด้วย (ภาพที่ 4.8) โดยเมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงลดลง การผลิตลิพิด  
ภายในเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งยีสต์จะมีการสะสมลิพิดได้ในปริมาณสูงที่ช่วงของอุณหภูมิตั้งแต่  
15 ถึง 30 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 192 ชั่วโมง  
ยีสต์มีปริมาณลิพิดภายในเซลล์แตกต่างจากอุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยมี  
ปริมาณลิพิดภายในเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 55.50 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง เช่นเดียวกับปริมาณ  
เซลล์แห้งและลิพิดทั้งหมดที่ตรวจพบว่ามีปริมาณมากกว่าสภาวะอื่น ๆ คือ 6.85 และ 3.80 กรัมต่อ  
ลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเพราะที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้เอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์มีกิจกรรมลดลง  
ในขณะเดียวกันยังทำให้การสังเคราะห์ mRNA เกิดได้น้อย ส่งผลต่อการผลิตโปรตีนซึ่งจำเป็นต่อ  
การเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ภายใต้สภาวะดังกล่าวยังทำให้เซลล์มีการสังเคราะห์สารในกลุ่มของ

ลิวินเพิ่มสูงขึ้น เพื่อช่วยในการขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเพื่อให้เซลล์ยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Rose และ Harrison, 1987) ทั้งนี้อาจเพราะที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้เอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์มีกิจกรรมลดลง ในขณะที่เดียวกันยังทำให้การสังเคราะห์ mRNA เกิดได้น้อย ส่งผลต่อการผลิตโปรตีนซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ภายใต้สภาวะดังกล่าวยังทำให้เซลล์มีการสังเคราะห์สารในกลุ่มของลิวินเพิ่มสูงขึ้น เพื่อช่วยในการขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเพื่อให้เซลล์ยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Rose และ Harrison, 1987)



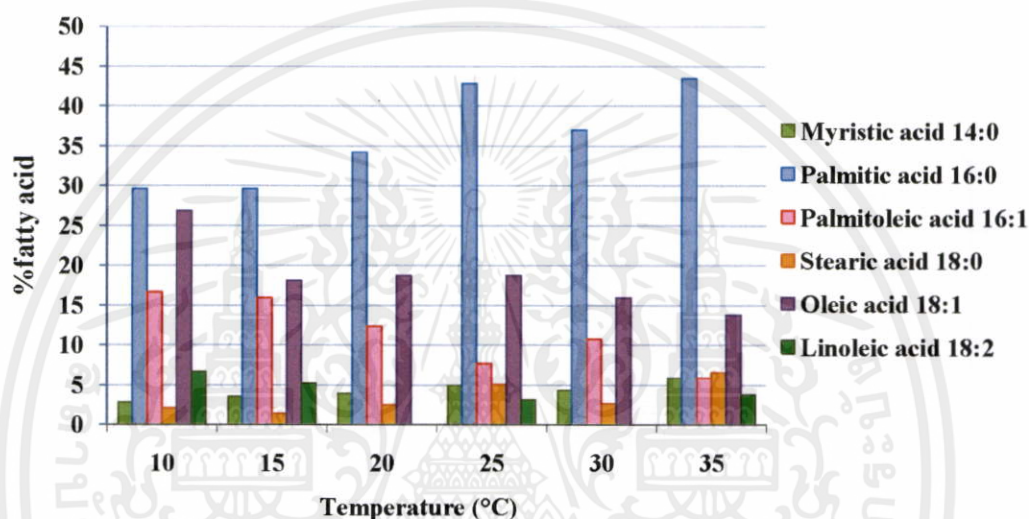
ภาพที่ 4.8 การผลิตลิวินโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะสแตชันนารีคือ ที่อุณหภูมิ 10 และ 15 องศาเซลเซียส นาน 240 ชั่วโมง 20 และ 25 องศาเซลเซียส นาน 192 ชั่วโมง และ 30 และ 35 องศาเซลเซียส นาน 144 ชั่วโมง ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

#### 4.2.2 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

ภาพที่ 4.9 แสดงการวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันในตัวอย่างลิวินจากยีสต์ที่ทำกรเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี โดยพบว่าปริมาณร้อยละของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงลดต่ำลง กรดไขมันหลักที่พบคือกรดปาล์มิติกซึ่งจะมีปริมาณร้อยละสูงกว่ากรดไขมันชนิดอื่น โดยภายใต้อุณหภูมิ 35, 30 และ 25 องศาเซลเซียส พบกรดปาล์มิติกถึงร้อยละ 43.47, 37.01 และ 42.84 ตามลำดับ ในขณะที่กรดลิโนเลอิกจะถูกพบในปริมาณน้อยที่สุด และไม่พบที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบในปริมาณสูงคือกรดโอเลอิก โดยมีปริมาณสูงที่สุดภายใต้อุณหภูมิ 10 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการคัดค้านจากทางต้นฉบับให้คิดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส (ร้อยละ 26.84) ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของ Suutari และคณะ (1997) ที่ศึกษาถึงการลดลงของอุณหภูมิต่อองค์ประกอบของลิพิดและชนิดของกรดไขมันในเชื้อหุ้มเซลล์ โดยพบว่ายีสต์ *Candida utilis* จะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มสูงขึ้นเมื่อยีสต์มีการเจริญภายใต้อุณหภูมิที่ลดลง ขณะที่ปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวจะลดลงตามอุณหภูมิ เนื่องมาจากกรดไขมันอิ่มตัวจะถูกใช้ในการสังเคราะห์กรด ลิโนเลอิก ซึ่งเกิดจากการสร้างพันธะคู่บริเวณเชื้อหุ้มเซลล์ขณะเซลล์มีการปรับตัวต่ออุณหภูมิ ใน



ภาพที่ 4.9 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในตัวอย่างลิพิดจากยีสต์น้ำมัน *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ

งานวิจัยของ Rodriguez-Vargas และคณะ (2007) ได้อธิบายถึงการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่อุณหภูมิต่ำว่า จุลินทรีย์จะมีกลไกการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของชนิดไขมันและโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบในเชื้อหุ้มเซลล์ โดยเมื่อฟอสโฟลิพิดที่พบในเชื้อหุ้มเซลล์มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ จะทำให้มีจุดหลอมเหลวต่ำ และมีความยืดหยุ่นสูงกว่าฟอสโฟลิพิดที่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอิ่มตัว การปรับตัวนี้ยังเกี่ยวข้องกับการชักนำของเอนไซม์ fatty acid desaturases ซึ่งจะทำให้เกิดพันธะคู่ในกรดไขมันที่เชื่อมต่อกับเชื้อหุ้มเซลล์ การที่ยีสต์มีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูงยังช่วยให้สารอาหารผ่านเข้าออกเชื้อหุ้มเซลล์ได้ง่ายแม้ต้องเจริญภายใต้อุณหภูมิต่ำ คุณสมบัตินี้จะช่วยให้เกิดการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ และทำให้เซลล์ยังคงเจริญต่อไปได้ (Rose และ Harrison, 1987) ขณะที่ Laoteng และคณะ (2010) ได้อธิบายถึงการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวภายใต้อุณหภูมิต่ำที่ถูกควบคุมโดยการถอดรหัสของยีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปรับตัวของเซลล์เพื่อให้เชื้อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการทำงานหรือขนส่งสาร ทั้งนี้กรดไขมัน

อิมตัวยังถูกใช้เป็นสารตัวกลางในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (Amaretti และคณะ, 2010)

จากการวิเคราะห์ปริมาณลิวคินทั้งหมดที่อุณหภูมิต่าง ๆ จึงเลือกการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 มาเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดลิวคินเพื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมี รวมถึงทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรในขั้นตอนต่อไป

#### 4.3 ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีของลิวคินที่ผลิตโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123

เมื่อนำสภาวะที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยง และทำการสกัดลิวคินออกจากเซลล์ด้วยวิธี acid hydrolysis จะได้ตัวอย่างลิวคินที่มีลักษณะเป็นของเหลวขุ่น มีสีเหลืองเข้ม เมื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมีต่าง ๆ (ตารางที่ 4.2) พบว่าลิวคินที่ได้มีค่าไอโอดีนเท่ากับ 57.8 กรัมต่อ 100 กรัมลิวคิน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำมันที่ได้จากพืชคือน้ำมันปาล์มที่มีค่าไอโอดีนอยู่ในช่วง 50-55 (Codex Standard for Named Animal Fats, 1999) ซึ่งค่าไอโอดีนจะใช้บอกปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในตัวอย่าง หากมีค่าสูงแสดงว่ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบมาก ส่งผลให้เกิดการเหม็นหืนที่มีออกซิเจนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (oxidative rancidity) ได้ง่าย ค่าไอโอดีนยังแสดงถึงคุณค่าทางโภชนาการของไขมันเนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นต่อร่างกาย ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง (นิธิยา รัตนานนท์, 2549)

ตารางที่ 4.1 สมบัติทางเคมีของลิวคินที่ผลิตโดยยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123

สมบัติทางเคมี		
ค่าไอโอดีน	57.8	กรัมต่อ 100 กรัมลิวคิน
เลขซาฟอนนิฟิเคชัน	187.0	มิลลิกรัม โบตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมลิวคิน
ค่าเปอร์ออกไซด์	8.4	มิลลิสมมูลต่อกิโลกรัม
ค่าความเป็นกรด	5.7	มิลลิกรัม โบตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมลิวคิน

จากการวิเคราะห์เลขซาฟอนนิฟิเคชันพบว่าตัวอย่างลิวคินมีเลขซาฟอนนิฟิเคชันเท่ากับ 187 ซึ่งใกล้เคียงกับเลขซาฟอนนิฟิเคชันของน้ำมันงา (187-195) น้ำมันข้าวโพด (187-195) และน้ำมันเมล็ดทานตะวัน (188-194) ซึ่งถือว่าต่ำกว่าเลขซาฟอนนิฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม (190-209) และน้ำมันมะพร้าว (248-265) (Codex Standard for Named Animal Fats, 1999) การที่ลิวคินมีเลขซาฟอน

นิพิเคชันต่ำแสดงถึงกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงมีจำนวนโมเลกุลในไตรกลีเซอไรด์ต่อหน่วยน้ำหนักน้อย ค่าที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสจึงต่ำ

ค่าเปอร์ออกไซด์ในตัวอย่างลิพิดมีค่าเท่ากับ 8.4 มิลลิสมมูลต่อกิโลกรัมลิพิดซึ่งบ่งชี้ถึงปริมาณสารเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่ในลิพิดตัวอย่าง หากค่าเปอร์ออกไซด์สูงแสดงว่าเกิดการออกซิเดชันมาก จึงทำให้มีสารประกอบเปอร์ออกไซด์สูง ซึ่งโดยปกติน้ำมันบริโภคควรมีค่าเปอร์ออกไซด์ไม่เกิน 10 (Codex Standard for Named Animal Fats, 1999)

จากการวิเคราะห์ค่าของกรดพบว่าลิพิดมีค่าของกรด 5.7 มิลลิกรัมไปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมลิพิด โดยค่าของกรดจะบ่งชี้ปริมาณกรดไขมันอิสระที่มีในตัวอย่าง หากค่าความเป็นกรดสูงแสดงว่าไตรกลีเซอไรด์อาจถูกทำลายไปมากจึงทำให้มีกรดไขมันอิสระมาก ซึ่งการสลายตัวของไตรกลีเซอไรด์อาจเนื่องมาจากกระบวนการต่าง ๆ เช่น การประกอบอาหาร หรือการย่อยโดยเอนไซม์จากตัวน้ำมัน ที่อาจทำให้ค่าของกรดสูงขึ้น ตามปกติค่าของกรดที่ถูกต้องตามมาตรฐานของ Codex ในน้ำมันทั่วไปที่ผ่านกระบวนการหีบเย็น (cold press) หรือสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ 4.0 ขณะที่ในน้ำมันปาล์มดิบมีค่ามาตรฐานของกรดอยู่ที่ 10.0 ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์ไลเปสจากผลปาล์มซึ่งสามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ ทำให้มีปริมาณของกรดไขมันอิสระสูงขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา (Low และคณะ, 2007) เช่นเดียวกับลิพิดที่ได้จากยีสต์ ซึ่งยีสต์จะมีการสร้างเอนไซม์ไตรเอสเตอเรส กลีเซอรอลไลเปสที่สามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ทำให้มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง (Czabany และคณะ, 2007) โดยกระบวนการทำบริสุทธิ์ (refining) จะสามารถกำจัดปริมาณกรดไขมันอิสระและทำให้ค่าความเป็นกรดในตัวอย่างลิพิดลดลงได้ ซึ่งค่ามาตรฐานของกรดในน้ำมันที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์จะแตกต่างกันไปตามกฎหมายของแต่ละประเทศ คือมาตรฐาน Codex ไม่เกิน 0.6 กฎหมายของประเทศญี่ปุ่น ต้องไม่เกิน 2.5 ประเทศเนเธอร์แลนด์ ต้องไม่เกิน 4.5 เป็นต้น (Codex Standard for Named Animal Fats, 1999; Berger, 2005)

#### 4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ใน 4 ตัวอย่างคือ เซลล์ทั้งหมด เซลล์ที่ผ่านการโซนิเคท กากเซลล์ และลิพิดสกัดหยาบ (ตารางที่ 4.1) พบว่าในตัวอย่างเซลล์ที่ผ่านการโซนิเคทมีปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุดคือ 3.761 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่ในกากเซลล์ซึ่งผ่านการสกัดลิพิดออกมีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่ำที่สุดคือ 0.699 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ทั้งนี้เนื่องมาจากการสกัดลิพิดมีการใช้ตัวทำละลายซึ่งเป็นสารละลายที่ไม่มีสี จึงสามารถละลายแคโรทีนอยด์ออกไปพร้อมกับลิพิดได้ ทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่หลงเหลือในกากเซลล์มีปริมาณต่ำ ขณะที่การโซนิเคทเซลล์จะช่วยทำให้การสกัดได้ดี

ยิ่งขึ้น จึงพบแคโรทีนอยด์ในเซลล์แห้งที่ผ่านการโชนิกที่สูงกว่าในตัวอย่างอื่น (Pashovkin และ Sadikova, 2008)

ซึ่งปริมาณแคโรทีนอยด์ที่พบในยีสต์ *Rs. toruloides* TISTR 5123 ทั้งในเซลล์ทั้งหมด (3.370 มิลลิกรัมต่อกรัม) และเซลล์ที่ผ่านการโชนิกที่มีปริมาณใกล้เคียงกับรายงานของ Aksu และ Eren (2007) ที่พบปริมาณแคโรทีนอยด์ในยีสต์ *R. glutinis* 4.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หลังการเพาะเลี้ยงแบบแบชในอาหารที่มีส่วนประกอบของกากน้ำตาลจากอ้อย เป็นเวลา 240 ชั่วโมง

ขณะที่ในตัวอย่างลิจิดสกัดหยาบพบปริมาณแคโรทีนอยด์ 3.427 มิลลิกรัมต่อกรัมลิจิด และเมื่อเทียบกับปริมาณของอาหาร พบปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 13.022 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณแคโรทีนอยด์ที่หลงเหลือในลิจิดถือเป็นข้อดีของการผลิตลิจิดเพื่อบริโภคจากยีสต์ในตระกูล *Rhodospiridium* sp. อื่นๆที่ยังเหมาะที่จะใช้คุณสมบัติดังกล่าวมาเป็นตัวเลือกในการผลิตลิจิดเพื่อสุขภาพหรือเพื่อเป็นส่วนประกอบในอาหารเสริมต่อไป

**ตารางที่ 4.2** ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดจากลิจิดสกัดหยาบ และเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 ภายใต้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 144 วัน

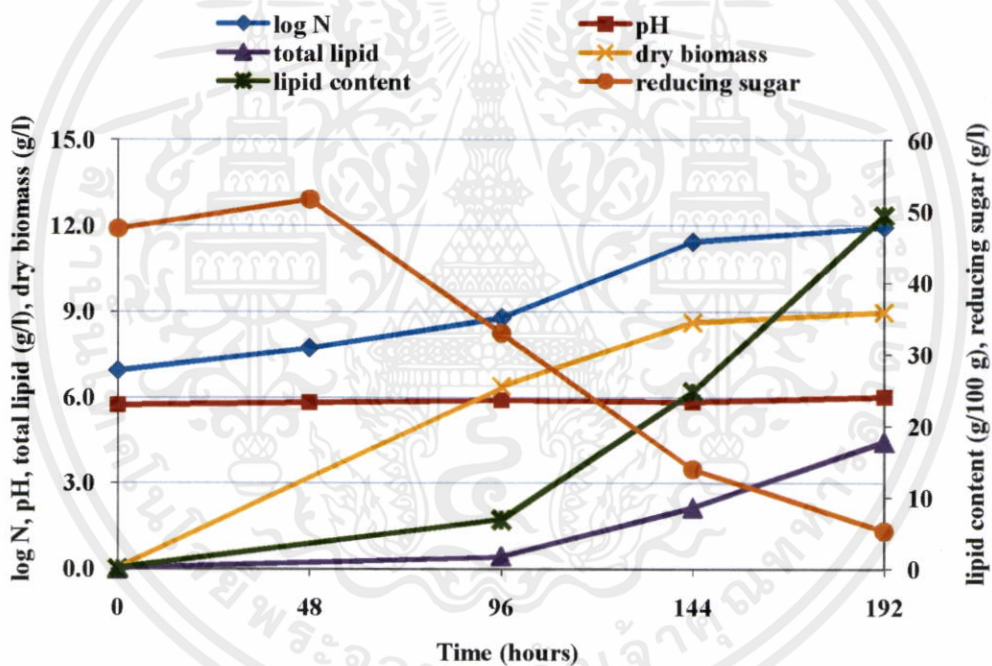
ชนิดตัวอย่าง	แคโรทีนอยด์ทั้งหมด (total carotenoid)	
	ต่อน้ำหนักตัวอย่าง	ต่อปริมาณอาหาร
เซลล์ทั้งหมด	3.370 mg/g dry biomass	23.084 mg/l
กากเซลล์จากการสกัดลิจิด	0.699 mg/g dry biomass	4.788 mg/l
เซลล์ผ่านการโชนิก	3.761 mg/g dry biomass	25.763 mg/l
ลิจิดสกัดหยาบ	3.427 mg/g lipid	13.022 mg/l

#### 4.5 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 แบบแบชในถังหมักแบบกวน ขนาด 5 ลิตร

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบกวน Biostat® B ขนาด 5 ลิตร บรรจุปริมาณอาหาร 3.5 ลิตร ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 ควบคุมอุณหภูมิเป็น 20 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 5.6 อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาทีและออกซิเจนละลายร้อยละ 40-50 เป็นเวลา 192 ชั่วโมง พบว่ายีสต์มีจำนวนเซลล์ (log N) สูงในช่วง 96 ถึง 144 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ ใช้งาน การค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทางสนธิสัญญาห้ามมิให้คัดลอกแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มาใช้

ยีสต์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และอัตราการเพิ่มของจำนวนเซลล์จะเริ่มลดลงหลัง 144 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง โดยการเจริญที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาเดียวกัน ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วง 0 ถึง 48 ชั่วโมงแรกมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 47.56 เป็น 51.66 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจึงมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องมาจากยีสต์มีการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยโมเลกุลของซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือน้ำตาลรีดิวซ์ ในระยะนี้จึงทำให้ในอาหารมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงขึ้น หลังระยะที่มีการปรับตัวและเข้าสู่การเจริญ ยีสต์จึงมีการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในอาหารเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มจำนวน (Rose และ Harrison, 1987) เมื่อพิจารณาค่าของพีเอชพบว่า พีเอชมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าพีเอชค่อนข้างคงที่อยู่ระหว่าง 5.6-6.1



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ ในระหว่างการผลิตลิพิดโดย *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 ในน้ำอ้อยที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 ปริมาตรอาหาร 3.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที ปริมาณออกซิเจนละลายร้อยละ 40-50 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าจากการวิเคราะห์ปริมาณลิพิด พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 192 ชั่วโมง ยีสต์มีปริมาณลิพิดภายในเซลล์สูงที่สุดเป็น 49.37 กรัมต่อ 100 กรัมเซลล์แห้ง และมีปริมาณลิพิดทั้งหมด

เท่ากับ 4.42 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณลิปิดภายในเซลล์และปริมาณลิปิดทั้งหมดมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 96 ถึง 192 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ขณะที่ปริมาณเซลล์แห้งสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 8.97 กรัมต่อลิตร แต่การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งจะเกิดขึ้นในช่วง 48 ถึง 144 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเริ่มคงที่ ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งมีความสอดคล้องกับอัตราการเจริญที่เริ่มชะลอตัวหลังชั่วโมงที่ 144 ทั้งนี้เนื่องมาจากยีสต์เริ่มเข้าสู่ระยะสแตชันนารีการเพิ่มขึ้นของเซลล์จึงเริ่มลดลง และมีปริมาณเซลล์คงที่ (ภาพที่ 4.9) ในขณะที่เดียวกันยังทำให้เกิดการสังเคราะห์ลิปิด และทำให้เซลล์มีปริมาณลิปิดสูงที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองของ Dai และคณะ (2007) ที่ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. glutinis* ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในถังหมัก 5 ลิตรเป็นเวลา 108 ชั่วโมง ได้แสดงให้เห็นว่ายีสต์มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งได้ดีในช่วง 12 ถึง 72 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง และจะพบการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงที่สุด เมื่อยีสต์มีการเจริญช้าลง หลังจากนั้นปริมาณลิปิดทั้งหมดและลิปิดภายในเซลล์จะลดลง แต่เนื่องจากอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงยีสต์ค่อนข้างสูง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและการเข้าสู่ระยะสแตชันนารีจึงสั้น

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rs. toruloides* TISTR 5123 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเมื่อพิจารณาผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบว่ายีสต์มีอัตราการผลิตเซลล์แห้ง ( $Q_x$ ) และอัตราการผลิตลิปิด ( $Q_p$ ) 1.122 และ 0.554 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ขณะที่อัตราการใช้สับสเตรท ( $Q_s$ ) 5.799 กรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งค่าพารามิเตอร์ที่ได้มีค่ามากกว่ารายงานของ Leasing และ Karraphan (2011) ที่ได้ศึกษาถึงจลนศาสตร์การเจริญของยีสต์ที่ผลิตน้ำมัน *Torulasporea maleeae* Y30 ซึ่งแยกได้จากดินที่พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ยีสต์มีอัตราการผลิตเซลล์แห้งและอัตราการผลิตลิปิด 0.816 และ 0.265 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ขณะที่อัตราการใช้สับสเตรทมีปริมาณใกล้เคียงกัน (5.51 กรัมต่อลิตรต่อวัน) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของยีสต์และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตกับการใช้สับสเตรท ( $Y_{p/s}$ ) มีค่าเท่ากับ 0.095 กรัมลิปิดต่อกรัมสับสเตรทและมีปริมาณผลผลิตจำเพาะ ( $Y_{p,x}$ ) 0.494 กรัมลิปิดต่อกรัมเซลล์แห้ง อัตราการผลิตลิปิดจำเพาะ ( $q_p$ ) มีค่าเป็น 0.099 กรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งอัตราการผลิตจำเพาะจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.201 โดยหาก  $\mu$  มีค่ามากจะแสดงให้เห็นว่ายีสต์มีการเจริญดี รวมไปถึงจะทำให้ค่า  $q_p$  มีค่ามากตามไปด้วย เมื่อทำการคำนวณหาค่าคงที่ของโมนอด ( $K_s$ ) จากสมการโมนอด พบว่ามีค่า  $K_s$  เท่ากับ 12.302 ซึ่งจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถดูดซับได้ ดังนั้นหาก  $K_s$  มีค่ามากแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการดูดซับสารอาหารของจุลินทรีย์จะน้อย (Leasing และ Karraphan, 2011)

จากการเพิ่มขนาดของการเพาะเลี้ยง พบว่ายีสต์มีการผลิตลิปิดทั้งหมดได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับภาวะหมักขนาดเล็กอื่น ๆ อีกหนึ่งงานวิจัยที่ดัดแปลงเนื้อหมักและต้องอ้างอิงถึงค่าของเอกสารที่กล่าวไว้ข้างต้นไว้ใช้กับการเพาะเลี้ยงในสภาวะทดลอง อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักสามารถ

ควบคุมได้ ทั้งปริมาณออกซิเจนละลายและอัตราการให้อากาศ ซึ่งไม่สามารถทำได้ในการเพาะเลี้ยงด้วยพลาสติก ข้อได้เปรียบของการเพาะเลี้ยงในถังหมักคือสามารถทำได้ในปริมาณมาก และยังสามารถทำได้จริงในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตลิวินจากยีสต์ในถังหมักต่อไป

**ตารางที่ 4.3** ค่าของพารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 ในถังหมักแบบกวนขนาด 5 ลิตร ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง

Kinetic parameter		Ref. <sup>a</sup>
Biomass rate, X (g/l)	8.972	6.530
Lipid, P (g/l)	4.430	2.120
Specific growth rate, $\mu$ (day <sup>-1</sup> )	0.201	0.316
Cell yield coefficient, $Y_{X/S}$ (g dry cell/g substrate)	0.193	0.148
Process product yield, $Y_{P/S}$ (g lipid/g substrate)	0.095	0.048
Specific yield of lipid $Y_{P/X}$ (g lipid/g cell)	0.494	0.325
Volumetric rate of substrate consumption, $Q_S$ (g/l.d)	5.799	5.510
Volumetric cell mass production rate, $Q_X$ (g cell/l.d)	1.122	0.816
Lipid production rate $Q_P$ (g/l.d)	0.554	0.265
Specific rate of substrate consumption, $q_S$ (g substrate/g cell. d)	0.646	0.843
Specific rate of lipid production, $q_P$ (g /l.d)	0.099	0.103
Monod's constant, $K_S$	12.302	24.520

หมายเหตุ : <sup>a</sup>อ้างอิงจาก Leasing และ Karraphan (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 จากการศึกษาการผลิตลิพิดจากอ้อยโดยใช้ยีสต์น้ำมัน *Rs. toruloides* TISTR 5123 โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (35 องศาเซลเซียส) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอ้อยเป็นองค์ประกอบ ที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 ให้ปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงที่สุดคือ 2.59 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกสภาวะนี้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตลิพิด

5.1.2 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 10, 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น โดยเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 192 ชั่วโมง ทำให้ยีสต์มีปริมาณลิพิดทั้งหมดสูงที่สุดคือ 3.80 กรัมต่อลิตร ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ 55.50 กรัมต่อ 100 กรัม ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 6.85 กรัมต่อลิตร องค์ประกอบของลิพิดที่ได้จากอุณหภูมิต่าง ๆ ประกอบด้วย กรดปาล์มติกเป็นส่วนใหญ่ โดยกรดไขมันอิ่มตัวจะมีปริมาณลดลงตามอุณหภูมิที่ลดลง ในขณะที่ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะเพิ่มขึ้น

5.1.3 จากการตรวจวัดสมบัติทางเคมีพบว่า ลิพิดที่ผลิตโดยยีสต์ *Rs. toruloides* TISTR 5123 มีค่าไอโอดีน 57.8 กรัมต่อ 100 กรัมลิพิด เลขซาฟอนนิฟิเคชันเท่ากับ 187.0 ขณะที่ค่าความเป็นกรดและค่าเปอร์ออกไซด์เป็น 5.7 มิลลิกรัมไปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมลิพิดและ 57.8 กรัมต่อ 100 กรัมลิพิด ตามลำดับ

5.1.4 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่พบมากที่สุดคือ 3.761 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งในตัวอย่างเซลล์ที่ผ่านการ โชนิเคท ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับแคโรทีนอยด์ที่พบในตัวอย่างลิพิด (3.427 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) พบว่ากระบวนการสกัดลิพิดทำให้เกิดการสูญเสียแคโรทีนอยด์เพียงเล็กน้อย

5.1.5 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบแบบกวนขนาด 5 ลิตรพบว่า ยีสต์มีปริมาณลิพิดภายในเซลล์สูงที่สุด 49.37 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ปริมาณเซลล์แห้ง 8.97 กรัมต่อลิตรและปริมาณลิพิดทั้งหมด 4.42 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของการผลิตลิพิดพบว่า ยีสต์มีอัตราการผลิตเซลล์แห้ง ( $Q_X$ ) อัตราการผลิตลิพิด ( $Q_P$ ) อัตราการใช้สับสเตรท ( $Q_S$ ) เป็น 1.122, 0.554 และ 5.799 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ขณะที่การใช้สับสเตรท ( $Y_{P/S}$ ) มีค่า

เอกสารนี้เท่ากับ 0.095 กรัมลิพิดต่อกรัมสับสเตรท ปริมาณผลผลิตจำเพาะ ( $Y_{P/X}$ ) 0.494 กรัมลิพิดต่อกรัมการคำนวณว่ากรณีเซลล์แห้ง อัตราการผลิตลิพิดจำเพาะ ( $q_p$ ) 0.099 กรัมต่อและอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) 0.201 ต่อวัน

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 สิ่งสำคัญของการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตลิพิด นอกจากสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง สายพันธุ์ของยีสต์ก็ถือเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารได้แตกต่างกัน ในการทดลองจึงต้องเลือกสายพันธุ์ยีสต์ให้เหมาะสม

5.2.2 การเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมอาจต้องมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ มากกว่าการศึกษาในระดับห้องทดลอง โดยอาจมีการศึกษาถึงผลของออกซิเจนละลาย หรือปริมาณการให้ เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงผลของปัจจัยดังกล่าวต่อการผลิตลิพิดของยีสต์ต่อไป

5.2.3 ควรใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้สามารถผลิตลิพิดได้สูงขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2553. ข้อมูลการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เข้าถึงได้จาก [www.moac.go.th](http://www.moac.go.th) (26 สิงหาคม 2554).
- นิธิยา รัตนานพนธ์. 2549. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล. 2549. กรดไขมันชนิดไหนที่เราต้องการ. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. ปทุมธานี. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21 (4): 51-56.
- รัตนภรณ์ สีสิ่ง. 2551. การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 36 (2):129-138.
- อัจฉราวรรณ ทงมี. 2530. การสกัดกรดไขมันจากยีสต์ไรโดโทรูลา กราซิลิส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.
- Abe, K., and T. Sasakuma. 1986. Identification of a diploid self-sporulating cycle in the basidiomycetous yeast *Rhodospodium tovuroides*. *Journal of General Microbiology*. 132:1459-1465.
- Aksu, Z., and A.T. Eren. 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*. 35:107-113.
- Alvarez, R.M., B. Rodriguez, J.M. Romano, A.O. Diaz, E. Gomez, D. Moro, L. Navarro, G. Saura, and J.L. Garcia. 1992. Lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis* on sugar cane molasses in single-stage continuous culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8 (2):214-215.
- Amaretti A, S. Raimondi, M. Sala, L. Roncaglia, M.D.A. Lucia Leonaedi, and M. Rossi. 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial Cell Factories*. 9:73.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists Official Method. 2000. Oil and fat. Official method of analysis of AOAC international. 16<sup>th</sup> ed. Washington DC.
- Athenstaedt, K., and G. Daum. 2006. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63:1355-1369.

Berger, B.G. 2005. *Frying oil series: The use of palm oil in frying*. Malaysian palm oil promotion council Publishing., Selangor.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาดูงาน ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ เช่น การค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bhattacharya, P.K., S.D. Shilpi Agarwal, and U.V.S. Rama Gopal. 2001. Ultrafiltration of sugar cane juice for recovery of sugar: analysis of flux and retention. *Separation and Purification Technology*. 21:247-259.
- Blagovic, B., J. Rupplic, M. Mesaric, K. Georgiu, and V. Maric. 2001. Lipid composition of brewer's yeast. *Food technology and Biotechnology*. 39(3):175-181.
- Bogdanov, S. 2002. Harmonised methods of the international honey commission. Swiss Bee Research Centre Inc. Switzerland.
- Carman, G.M., and G.S. Han. 2009. Regulation of phospholipid synthesis in yeast. *Journal of Lipid Research April Supplement*. 50:S69-S73.
- Codex Standard for Named Animal Fats, Codex-Stan 211-1999. 1999. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome. Available:[http://www.codexalimentarius.net/standards\\_search.asp](http://www.codexalimentarius.net/standards_search.asp) (accessed 25 August 2011).
- Converti A., C. A. Alessandro, E.Y. Ortiz, P. Perego, and M.D. Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 48 (6):1146-1151.
- Czabany, T., A. Wagner, D. Zweytick, K. Lohner, E. Leitner, E. Ingolic, and G. Daum. 2008. Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biological chemistry*. 283: 17065-17074.
- Dai, C.C., J. Tao, X. Feng, Y.J. Dai, and M. Zhao. 2007. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*. 6 (18):2130-2134.
- Dermirbas, A. 2009. Production of Biodiesel from Algae Oils. *Energy Sources, Part A*. 31:163-168.
- Evant, C.T., and C. Ratledge. 1984. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Journal of General Microbiology*. 130:1693-1704.
- Fell, J.W., and C.P. Kurtzman. 1998. *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier science B. V., Amsterdam.
- Gotoh, N., and S. Wada. 2006. The Importance of peroxide value in assessing food quality and food safety. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 83 (5):473-477.

- Grandhi, S.R., and J.D. Weete. 1991. Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium uftimum*. *Journal of General Microbiology*. 137:1825-1830.
- Guschina, I.A., and J.L. Harwood. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. 45 (2):160-186.
- Johnson, V., M. Singh, V.S. Saini, V.R. Sista, and N.K. Yadave. 1992. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8:382-384.
- Kalscheuer, R., T. Stöveken, U. Malkus, R. Reichelt, P.N. Golyshin, J.S. Sabirova, M. Ferrer, K.N. Timmis, and A. Steinbüchel. 2007. Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: Evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria. *Journal of Bacteriology*. 189 (3):918-928.
- Karatay, S.E., and G. Donmez. 2010. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource Technology*. 101:7988–7990.
- Khaneja, R., L. Perez-Fons, S. Fakhry, S. Baccigalupi, E. To, G. Sandmann, T.C. Dong, E. Ricca, P.D. Fraser, and S.M. Cutting. 2009. Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology*. 108:1889–1902.
- Kraisintu, P., W. Yongmanitchai, and S. Limtong. 2010. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)*. 44:436–445.
- Kwon, D.Y., and J.S. Rhee. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 63 (1):89-91.
- Laoteng K, M. čertík, and S. Cheevadhanark. 2010. Mechanisms controlling lipid accumulation and polyunsaturated fatty acid synthesis in oleaginous fungi. *Chemistry and Material Science*. 65(2):97-103.
- Lederberg, J. 1992. *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press Inc., New York.
- Leesing, R., and P. Karraphan. 2011. Kinetic growth of the isolated oleaginous yeast for microbial lipid production. *African Journal of Biotechnology*. 10(63):13867-13877.
- Le-ping, Z., H. Ju-fang, Q. Guan-zhou, C. Feng-you, C. Dan, , T. Jian-bin, and L. Xue-gang. 2009. Isolation and identification of *Rhodospiridium diobovatum* DS0205 from deep-sea sediment of eastern Pacific Ocean. *Journal Central South University*. 16:0942-0947.

- Li, N., Z.N. Deng, Y.L. Qin, C.L. Chen, and Z.Q. Liang. 2008. Production of polyunsaturated fatty acids by *Mucor recurvus*. with sugarcane molasses as the carbon source. Food Technology and Biotechnology. 46 (1):73–79.
- Li, Y.H., B. Lui, Z.B. Zhao, and F.W. Bai. 2006. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. Chinese Journal of Biotechnology. 22 (4):650–656.
- Liu, G.Q., Q.L. Lin, X.C. Jin, X.L. Wang, and Y. Zhao. 2010. Screening and fermentation optimization of microbial lipid-producing molds from forest soils. African Journal of Microbiology. 4(14):1462-1468.
- Low, C.T., R. Mohamad, C.P. Tan, K. Long, R. Ismail, S.K. Lo, and O.M. Lai. 2007. Lipase-catalyzed production of medium-chain triacylglycerols from palm kernel oil distillate: Optimization using response surface methodology. European Journal of Lipid Science and Technology. 19:107-119.
- Maldonado, R.I., D.B. Rodriguez-Amaya, and R.P. Scamparini. 2008. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. Food Chemistry. 107:145–150.
- Martin, C.E., C.S. Oh, and Y. Jiang. 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. Biochimica et Biophysica Acta. 1771:271–285.
- Meng, X., J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie, and M. Xian, 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy. 34:1–5.
- Neilson, S.S. 1998. Food Analysis. 2<sup>nd</sup> ed. Aspen Publishers.Inc. Gaithersbrug, Maryland.
- Pashovkin, T. N., and D.G. Sadikova. 2008. Cell exfoliation, separation, and concentration in the field of a standing ultrasonic wave. Acoustical Physics. 55:584–593.
- Patnayak, S., and A. Sree. 2005. Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. Letters in Applied Microbiology. 40:358–363.
- Picataggio, S.K., N.S. Yadav, and Q.Q. Zhu. 2007. Production of polyunsaturated fatty acid in oleaginous yeast. Patent Application Publication. US 20070207528 A1. United States.
- Prasitchoke, P., Y. Kaneko, T. Bamba, E. Fukusaki, A. Kobayashi, and S. Harashima. 2007. Identification and characterization of a very long-chain fatty acid elongase gene in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. Gene. 391:16–25.
- Quoc, K.P., and J.P. Dubacq. 1997. Effect of growth temperature on the biosynthesis of eukaryotic lipid molecular species by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Biochimica et Biophysica Acta. 1346:237-246.

- Ratledge, C., and C.T. Evans. 1989. The yeasts vol.3 metabolism and physiology of yeasts: lipid and their metabolism. In Pose A.H. and Harrison J.S, editors. Academic Press Limited., New York.
- Ratledge, C., and K.H. Tan. 1990. Oil and fat: Production, degradation and utilization by yeasts. In Verachert, H. and Mot, R.D., editors. Marcel Dekker Inc., New York.
- Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society Transaction*. 30:1047-1050.
- Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*. 86:807–815.
- Rintala, E. 2010. Effects of oxygen provision on the physiology of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Faculty of Biological and Environmental Sciences. Department of Biosciences Division of General Microbiology. University of Helsinki, Finland.
- Rodriguez-Vargas, S., A. Sanchez-Garcia, J.M. Martinez-Rivas, J.A. Prieto, and F. Randez-Gill. 2007. Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Applied and environmental microbiology*. 73:110-116.
- Rose, A. H., and J. S. Harrison. 1987. The yeast : volume 2 yeast and environment. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press Inc., London.
- Ruiz-Vazquez, R.M., S. Torres-Martínez, and V. Garre. 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*. 48(1):22-27.
- Sabry, S.A., K.M. Ghanem, and H.H. Yusef. 1990. Production of microbial lipids from beet molasses. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 3(4):310-313.
- Saenge, C., and B. Cheirsilp. 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*. 46:210-218.
- Sakuradani, E., and S. Shimizu. 2009. Single cell oil production by *Mortierella alpine*. *Journal of Biotechnology*. 144 (1):31-36.
- Saxena, V., C.D. Sharma, S.D. Bhagat, V.S. Saini, and D.K. Adhikari. 1998. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75:501–505.

Shahidi, F. 2005. *Quality assurance of fats and oils*. 6<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc., Newfoundlnd.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sharma, S.C. 2006. Implications of sterol structure formembrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. Federation of European Microbiological Societies. 6:1047–1051.
- Shimizu, S., H. Kawashima, Y. Shinmen, K. Akimoto, and H. Yamada. 1988. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. Journal of the American Oil Chemists' Society. 65(9):1455-1459.
- Stene, L.C., G. Joner, and the Norwegian Childhood Diabetes Study Group. 2003. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, populationbased, case-control study. The American Journal of Clinical Nutrition. 78:1128 –34.
- Suutari, M., A. Rintam, and S. Laakso. 1997. Membrane phospholipids in temperature adaptation of *Candida utilis*: Alterations in fatty acid chain length and unsaturation. Journal of Lipid Research. 38: 790-794.
- Taskina, M., and S. Erdalb. 2011. Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* MT-5 in submerged fermentation using the extract from waste loquat kernels as substrate. Journal of Science Food Agriculture. 91:1440–1445.
- Vicente, G., L.F. Bautista, F.J. Gutierrez, R. Rodriguez, V. Martnez, R.A. Rodriguez-Frometa, R.M. Ruiz-Vazquez, S. Torres-Martinez, and V. Garre. 2010. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. Energy Fuels. 24(5):3173–3178.
- Weeks, B. S. 2003. Vitamin A and beta-carotene. Journal of Orthomolecular Medicine. 18:131-145.
- Wolford, S. 1996. Composition of cane juice. South African Sugar Technology Association. 70: 265-266.
- Yadav, N.S., Z. Xue and Q.Q. Zhu. 2009.  $\Delta$ 17 desaturaturase and its making polyunsaturated fatty acids. Patent Application Publication. US 007556949B2. United States.
- Ye, R.W. 2009. Coenzyme A10 production in a recombinant oleaginous yeast. Patent Application Publication. US 20090142322A1. United States.
- Yen, H-W., and Z. Zhang. 2011. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 112(1):71–74.
- Zhu, Q.Q. and D.M. Walters-Pollak. 2006. Production of gamma-linolenic acid in oleaginous yeast. Patent Application Publication. US 20060035351A1. United States.

เอกสารนี้เป็นเอกสารเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใด ๆ



**ภาคผนวก ก**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอ้อย ยีสต์สกัดและเปปโตเนเป็นองค์ประกอบตามตารางที่ ก1 ปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารด้วย 0.1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ จนได้พีเอชเท่ากับ 5.6

ตารางที่ ก1 สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอ้อยเป็นองค์ประกอบ สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์

ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)	เปปโตเน (กรัมต่อลิตร)	C:N
2.05	0.66	0.55	60:1
	1.32	1.10	60:2
	1.98	1.65	60:3
	2.64	2.20	60:4
5.09	1.66	1.38	60:1
	3.32	2.77	60:2
	4.98	4.15	60:3
	6.64	5.53	60:4
8.19	2.66	2.22	60:1
	5.33	4.44	60:2
	7.99	6.66	60:3
	10.65	8.88	60:4
12.28	3.99	3.33	60:1
	7.99	6.66	60:2
	11.98	9.99	60:3
	15.97	13.32	60:4
16.79	5.33	4.43	60:1
	10.66	8.86	60:2
	15.99	13.29	60:3
	21.32	17.72	60:4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้เพื่อการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา หรืออ้างถึงถึงเอกสารทุกครั้งโดยไม่ได้รับอนุญาต

## 2. สูตรอาหาร Yeast Peptone Dextrose (YPD) ที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อ

Yeast Extract	5	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

## 3. สูตรอาหาร Yeast Malt (YM)

Yeast Extract	3	กรัม
Malt Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การเตรียมสารเคมี

### 1. สารเคมีในการวิเคราะห์ Colorimetric method

#### 1.1 เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80

ดวงแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 99.1 จำนวน 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

#### 1.2 โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.5 M ในเอทานอลร้อยละ 80

ชั่งโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 84.165 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และปรับปริมาตรด้วยเอทานอลร้อยละ 80 ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

#### 1.3 สารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ (copper reagent)

ชั่งคอปเปอร์อะซิเตท (copper acetate) 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.1 ด้วยไพริดีน (pyridine) และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองก่อนเก็บไว้ใช้ (สารละลายคงตัวได้ 2 ปี ในที่ไม่มีแสง)

### 2. สารเคมีในการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

#### 2.1 สารเคมีในการวิเคราะห์เลขชาฟอนนิฟิเคชัน

##### 2.1.1 กรดไฮโดรคลอริก 0.5 N

ดวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

##### 2.1.2 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเข้มข้นร้อยละ 1

ชั่งฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

##### 2.1.3 สารละลาย alcoholic potassium hydroxide

ชั่งโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 35-40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ให้ครบ 1 ลิตร เก็บในตู้เย็น หากขุ่นให้ทิ้งค้างคืน เทเฉพาะส่วนใสมาใช้

#### 2.2 สารเคมีในการวิเคราะห์ค่าไอโอดีน

##### 2.2.1 สารละลาย Wijs's solution

ละลายไอโอดีนไตรคลอไรด์ 8 กรัมในกรดอะซิติก 200 มิลลิลิตร และละลายไอโอดีน 9 กรัมในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ 300 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งสองมาผสมเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยกรดอะซิติกเป็น 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การเรียงพิมพ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ผู้อื่นผู้ใดที่นำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ขอสงวนสิทธิ์ในสิ่งที่ปรากฏและขอสงวนสิทธิ์ในข้อมูลเอกสารทุกครั้งที่มีการแก้ไข

### 2.2.2 สารละลายไอโอไดด์ความเข้มข้นร้อยละ 10

เตรียมโดยชั่งไอโอไดด์ 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

### 2.2.3 โซเดียมไรโอซัลเฟตมาตรฐาน 0.1 M

ชั่งโซเดียมไรโอซัลเฟต 24.82 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

### 2.2.4 น้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1

ชั่งผงแป้ง 1 กรัมละลายในน้ำกลั่นคั้นเคือด 100 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นก่อนใช้และเตรียมทันทีก่อนใช้

### 2.3 สารเคมีในการวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์

สารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์อิ่มตัว

ละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์มากพอในน้ำคั้นสุกใหม่ เก็บในที่มืด

### 2.4 สารเคมีในการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

## 3. สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

### 3.1 สารละลายไดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์ (Dinitrosalicylic reagent : DNS reagent)

สารละลายกรด 3, 5-ไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ใน 2N NaOH 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโพแทสเซียม โซเดียมทาร์เทรตลงไป 30 กรัม คนให้ละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

### 3.2 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายกลูโคสที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (MW=180.2) โดยสารละลายกลูโคส 0.0901 กรัมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## 4. สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท

### 4.1 สารละลายซอกซ์เล็ท ( Soxhlet modification of Fehling solution)

เตรียมโดยผสมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (ข้อ 4.1.1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายอัลคาไลนัทธาเรต (ข้อ 4.1.2) โดยเมื่อผสมแล้วให้ใช้ทันที

4.1.1 สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate solution) สารละลาย  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  34.639 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดตวงปริมาตร

4.1.2 สารละลายอัลคาไลไนท์ทาเทรต (Alkaline tartrate solution) ละลาย  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Rochelle salt) 173 กรัม และ  $\text{NaOH}$  50 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดตวงปริมาตร เก็บไว้นาน 2 วันก่อนใช้

#### 4.2 สารละลายซูโครสมาตรฐานหรือสารละลายน้ำตาลอินเวิร์ทร้อยละ 1

ละลายซูโครส 9.5 กรัม ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือเข้มข้น (cone  $\text{HCl}$  35-37%) 5 มิลลิลิตร (โดยบรรจุกรดเกลือเข้มข้นนี้ไว้ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรให้ถึง 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นทิ้งไว้ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายสารละลายทั้งหมดลงในขวดตวงปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร จะได้สารละลายน้ำตาลอินเวิร์ทร้อยละ 1 ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นานหลายเดือน เมื่อต้องการใช้ ให้ใช้ปิเปตตวงปริมาตรตามต้องการ บรรจุสารที่เตรียมลงในขวดตวงปริมาตรแล้วทำให้เป็นกลางด้วย 1 N  $\text{NaOH}$  โดยใช้กระดาษลิตมัส (litmus) สีแดง แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามปริมาตรที่ต้องการใช้

#### 4.3. สารละลายเมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ร้อยละ 1

ละลายเมทิลีนบลู 1 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิธีวิเคราะห์

### 1. วิธีวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง (dry biomass) (AOAC, 2000)

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะต่าง ๆ 50 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ตักตะกอนเซลล์ใส่ด้วยอะลูมิเนียมเนียม (aluminium can) ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งหาน้ำหนักเซลล์เปียก (4 ตำแหน่ง) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์นาน 30 นาที ชั่งหาน้ำหนักแห้ง

คำนวณน้ำหนักแห้งจากสมการ

$$\text{น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้ง (กรัม)} \times 1000}{\text{ปริมาตรน้ำหมัก (50 มิลลิลิตร)}}$$

### 2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ (lipid content)

วิเคราะห์ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ด้วยวิธี colorimetric method (Kwon และ Rhee, 1986) ดังนี้

#### 2.1 วิธีวิเคราะห์ลิพิดในตัวอย่างตะกอนเซลล์ยีสต์

ชั่งตะกอนเซลล์ยีสต์ 1 กรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร เติม 1.5 M KOH ในเอทานอลร้อยละ 80 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น คัมให้เดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น เติม 2.5 M HCl 6 มิลลิลิตร และไอโซออกเทน 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 200-300 ครั้งต่อนาที เพื่อสกัดลิพิดออกมาอยู่ในชั้นของไอโซออกเทน จากนั้นบีบอัดสารละลายส่วนบนของไอโซออกเทน 3 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับคอปเปอร์รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าแรง ๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบน ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร คำนวณปริมาณลิพิดจากสมการของกราฟมาตรฐานกรดปาล์มิติก

#### 2.2 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานกรดปาล์มิติก

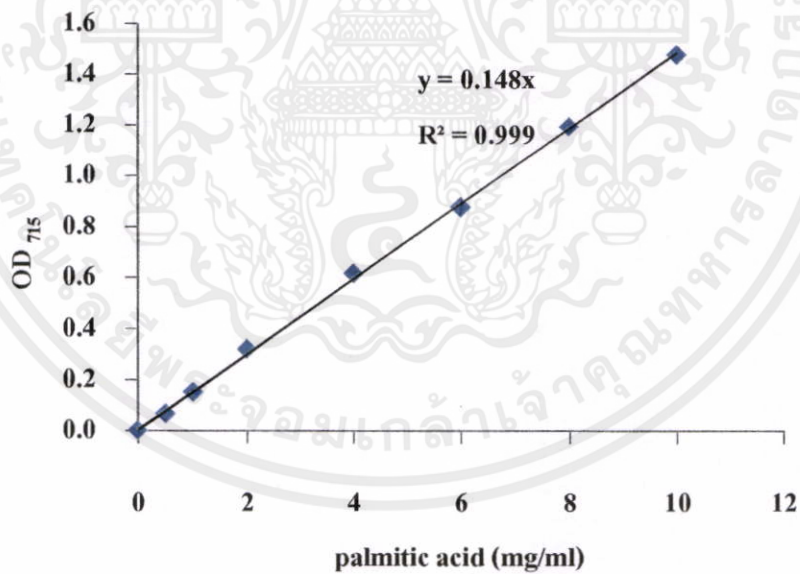
เตรียมสารละลายกรดปาล์มิติกมาตรฐาน (stock standard) 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดปาล์มิติก 0.5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยไอโซออกเทนเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียม working standard จากสารละลาย stock standard โดยนำมาเจือจางด้วยไอโซออกเทนดังตารางที่ 1 จากนั้นแต่ละระดับความเข้มข้นมา 3 มิลลิลิตร เติมคอปเปอร์รีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าหลอดแรง ๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบน ไปวัดค่าการดูด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สร้างขึ้นไว้สำหรับการศึกษาเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษา  
ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม อีกทั้งห้ามมิให้นำไปเผยแพร่และต้องแจ้งถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรณีไปใช้

คลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ ค1) และคำนวณปริมาณ  
 ลิพิดได้ตามสมการ

**ตารางที่ ค1** การเตรียมความเข้มข้นของกรดปาล์มติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของกรดปาล์มติก (มิลลิกรัม/3 มิลลิลิตร)	ปริมาตร stock standard (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของไอโซออกเทน (มิลลิลิตร)
0.50	0.10	2.90
1.00	0.20	2.80
2.00	0.40	2.60
4.00	0.80	2.20
6.00	1.20	1.80
8.00	1.60	1.40
10.00	2.00	1.00



**ภาพที่ ค1** กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มติกที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimetric method

**ปริมาณลิพิดภายในเซลล์คำนวณได้จาก**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ A × 100 ประโยชน์ด้านการค้า  
 ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ (กรัมต่อ 100 กรัมเซลล์แห้ง) =  $\frac{\text{น้ำหนักรวมเซลล์แห้งที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม)}}$   
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึง

เมื่อ A คือปริมาณลิพิด (กรัม) ที่คำนวณได้จากสมการของกราฟมาตรฐาน

### 3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณลิพิดทั้งหมด (total lipid) (Kwon และ Rhee, 1986)

การวิเคราะห์ปริมาณลิพิดทั้งหมดคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ปริมาณลิพิดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{A \times \text{ปริมาณเซลล์แห้งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม)}}$$

เมื่อ A คือปริมาณลิพิด (กรัม) ที่คำนวณได้จากสมการของกราฟมาตรฐาน

### 4. วิธีวิเคราะห์การเจริญของยีสต์

#### 4.1 กราฟมาตรฐานการเจริญของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123

เพาะเลี้ยงยีสต์ *Rs. toruloides* TISTR 5123 ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 ที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 144 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มานับปริมาณเซลล์ด้วยด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ( $2.4 \times 10^9$  cells/ml) จากนั้นเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดังกล่าวตามตารางที่ ค2 วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณเซลล์จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นกับปริมาณเซลล์ที่นับได้ (ภาพที่ ค2)

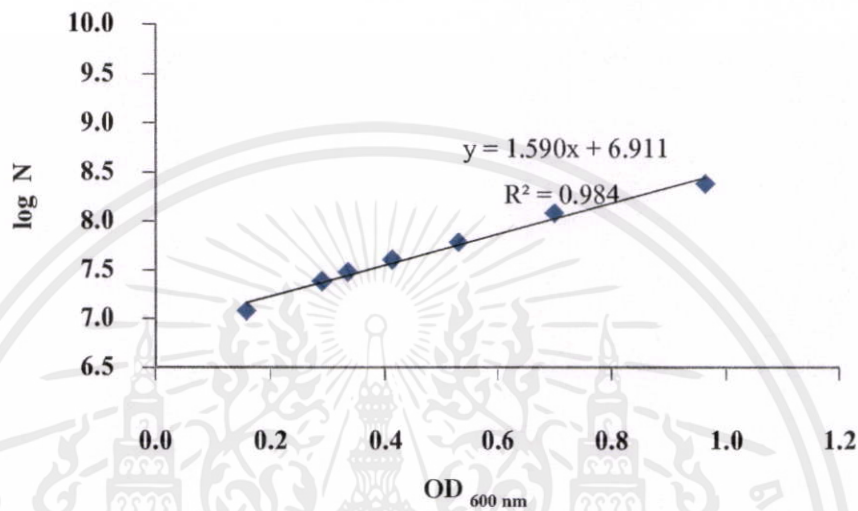
ตารางที่ ค2 การเจือจางอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

ปริมาณเซลล์ (cells/ml)	เจือจาง	log N
$1.2 \times 10^7$	200	7.079
$2.4 \times 10^7$	100	7.380
$0.3 \times 10^8$	80	7.477
$0.4 \times 10^8$	60	7.602
$0.6 \times 10^8$	40	7.778
$1.2 \times 10^8$	20	8.079
$2.4 \times 10^8$	10	8.381

#### 4.2 วิธีวัดการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
 ตรวจวัดการเจริญของยีสต์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Amaretti และคณะ (2010) ปีเปิด  
 ไม่ว่ากรณีใดบ้างคือทั้งนี้ไม่ได้แปลว่าผิดกติกาแต่อย่างใดจึงถึงเจ้าคุณเอกสารที่แจ้งที่ควรนำไปใช้  
 ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ 10 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยง  
 เชื้อบริสุทธิและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสง

อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน ทำการเก็บตัวอย่างครั้งแรกหลังเพาะเลี้ยงยีสต์เป็นเวลา 144 ชั่วโมง และเก็บต่อทุก ๆ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของยีสต์เริ่มมีค่าความขุ่นคงที่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์มีการเจริญเข้าสู่ระยะสแตชันนารี จากนั้นจึงเก็บเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณลิจิด



ภาพที่ ค2 กราฟมาตรฐานการเจริญของยีสต์ *Rhodospiridium torulooides* TISTR 5123

## 2. การวิเคราะห์เลขซาฟอนนิฟิเคชัน (AOAC 2000 ข้อ 41.1.18)

วิเคราะห์เลขซาฟอนนิฟิเคชัน (saponification number, SN) โดยชั่งตัวอย่างลิจิด 2 กรัม (4 ตำแหน่ง) ใส่พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติม alcoholic potassium hydroxide 25 มิลลิลิตร ปิดจุกต่อกับชุดรีฟลักซ์ 30 นาที ใน boiling water baths เขย่าเป็นระยะ เมื่อครบ 30 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วนำไปไทเทรตกับ 0.5 N HCl โดยมีฟีนอล์ฟทาเลอินเป็นอินดิเคเตอร์ แบลงค์ใช้ alcoholic potassium hydroxide 25 มิลลิลิตร ไทเทรตเช่นเดียวกับตัวอย่าง

$$SN = \frac{(B-S) \times 28.05}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ B คือ มิลลิลิตรของ 0.5 N HCl ที่ทำปฏิกิริยากับแบลงค์

S คือ มิลลิลิตรของ 0.5 N HCl ที่ทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง

## 5. การวิเคราะห์ค่าไอโอดีน (AOAC 2000 ข้อ 41.1.15)

วิเคราะห์ค่าไอโอดีน (iodine value, IV) โดยชั่งน้ำหนักของลิจิด (5-10 หยด) อย่างถูกต้อง 4 ตำแหน่ง ใส่พลาสติกขนาด 400 มิลลิลิตร เติมคาร์บอนเตตระคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่าง

ละลายแล้วเติมสารละลาย Wijs' solution 20 มิลลิลิตร โดยใช้ filter pipette เขย่าอย่างรวดเร็ว ปิดจุก เก็บในที่มืด (25-30 องศาเซลเซียส) 30 นาที หรือมากกว่า เท่ากับว่า 1 ชั่วโมงในตัวอย่างมีค่า ไอโอดีนมากกว่า 150 จากนั้นนำไปไทเทรตหาไอโอดีนที่เหลือด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.1 N โดยเขย่า ฟลask ตลอดเวลาที่ทำกรไทเทรต เมื่อได้สีเหลืองอ่อนหยุดไทเทรต เติมน้ำแข็ง 2-3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์เขย่าต่อจนกลายเป็นสีฟ้า แล้วไทเทรตต่ออย่างระมัดระวังโดยเขย่า ตลอดเวลา ไทเทรตจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นไม่มีสี สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้กับ น้ำมันตัวอย่างเท่ากับ a และที่ใช้กับแบลลงค์เท่ากับ b (ใช้โพตัสเซียมไอโอไดด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็น แบลลงค์ทำอย่างละ 2 ข้ว)

$$IV = \frac{(a-b) N \times 12.69}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ b คือ มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้แบลลงค์  
a คือ มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ตัวอย่าง  
N คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (0.1 N)

#### 6. การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (AOAC 2000 ข้อ 41.1.16)

วิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value, PV) โดยชั่งตัวอย่าง 5.00 กรัม ใส่ ฟลask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมของกรดอะซิติก:คลอโรฟอร์ม (3:2) จำนวน 30 มิลลิลิตร เขย่าให้น้ำมันตัวอย่างละลาย จากนั้นเติม 0.5 มิลลิลิตรสารละลายโพตัสเซียมไอโอไดด์อิ่มตัว เขย่า 1 นาที เติมน้ำ 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตมาตรฐาน โดยเขย่าตลอดเวลา ไทเทรตจนสีเหลืองจางหาย เติม 0.5 มิลลิลิตรน้ำแข็งความเข้มข้น ร้อยละ 1 แล้วไทเทรตต่อจนสีน้ำเงินหาย ถ้าใช้ 0.1 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 < 0.5$  มิลลิลิตร ให้ทำการทดลองใหม่ โดยไทเทรตด้วย 0.01 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  แทน ทำแบลลงค์โดยไม่ต้องเติมตัวอย่าง (แบลลงค์ควรใช้ 0.1 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \leq 0.1$  มิลลิลิตร)

$$PV = \frac{A-B}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เอกสารนี้เป็นเมื่อเอกสาร A คือ มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตมาตรฐานที่ใช้กับตัวอย่าง โยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น B คือ มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตมาตรฐานที่ใช้กับแบลลงค์ การนำไปใช้

## 7. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด (AOAC 2000 ข้อ 41.1.21)

วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด (acid value, AV) ชั่งตัวอย่าง 7.05 กรัม ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ปรับให้เป็นกลางด้วยการเติมฟีนอล์ฟทาลีน 2 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1M จนได้สารละลายสีชมพูอ่อน จากนั้นนำตัวอย่างไปไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.25M จนได้สีชมพูอ่อนคงที่นานมากกว่า 1 นาที ซึ่งปริมาตร (มิลลิลิตร) ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรตจะเท่ากับร้อยละของกรดไขมันอิสระในรูปของกรดโอเลอิก บันทึกค่าของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณค่าความเป็นกรด ตามสมการ

$$AV = \text{ร้อยละของกรดไขมันอิสระ (กรดโอเลอิก)} \times 1.99$$

\*\*ปริมาตรที่ใช้ไทเทรตจะเท่ากับร้อยละของกรดไขมันอิสระ

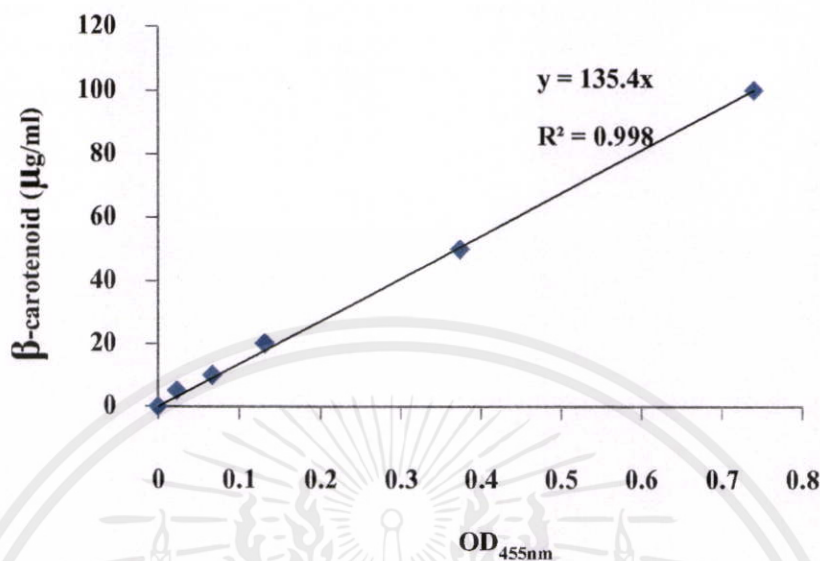
## 8. การวิเคราะห์แคโรทีนอยด์

### 8.1 เตรียมกราฟมาตรฐานของแคโรทีนอยด์

การวิเคราะห์กราฟมาตรฐานของแคโรทีนอยด์ คัดแปลงจากวิธี Saenge และ Cheirsilp, 2011

1. เตรียมสารละลาย  $\beta$ -carotene stock solution ซึ่งสารบีตาแคโรทีน 25 มิลลิกรัม (4 คำแห่ง) นำมาละลายในคลอโรฟอร์ม 2.5 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนเป็น 250 มิลลิลิตร จะให้ความเข้มข้นของบีตาแคโรทีน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. คูณสารละลาย stock มา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยอะซิโตนจะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของเบตาแคโรทีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน นำสารละลายที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2 มา 5, 10, 20 และ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยอะซิโตน ซึ่งสารละลาย 1 มิลลิลิตรจะมีความเข้มข้นของบีตาแคโรทีนเท่ากับ 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
4. นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ข้างต้น ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 455 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของบีตาแคโรทีนกับค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณหาปริมาณแคโรทีนทั้งหมดในตัวอย่างจากสมการของกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ ค3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค3 กราฟมาตรฐานของบีตาแคโรทีนอยด์

## 8.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

### 1. เซลล์ทั้งหมด

เก็บเซลล์สดจากสภาวะที่คัดเลือก นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 2. เซลล์ที่ผ่านการโซนิเคท

เก็บเซลล์สดจากสภาวะที่คัดเลือกไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator โดยใช้อัตราส่วน เซลล์:น้ำกลั่น เป็น 1:10 ที่แอมพลิจูดร้อยละ 85 เป็นเวลา 10 นาที แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ไป อบแห้งไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3. กากเซลล์

เก็บเซลล์จากกระบวนการย่อยด้วยกรด โดยแยกส่วนของกากเซลล์ออก จากนั้นนำไปอบที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 9. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Nelson, 1998)

### 9.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เปิดสารละลายมาตรฐานกลูโคส (ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม DNS reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน นำหลอดทดลองแช่ใน

อ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที เมื่อเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร บันทึกผลและนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกลูโคสในแต่ละความเข้มข้น จะได้กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสดังภาพที่ ค4

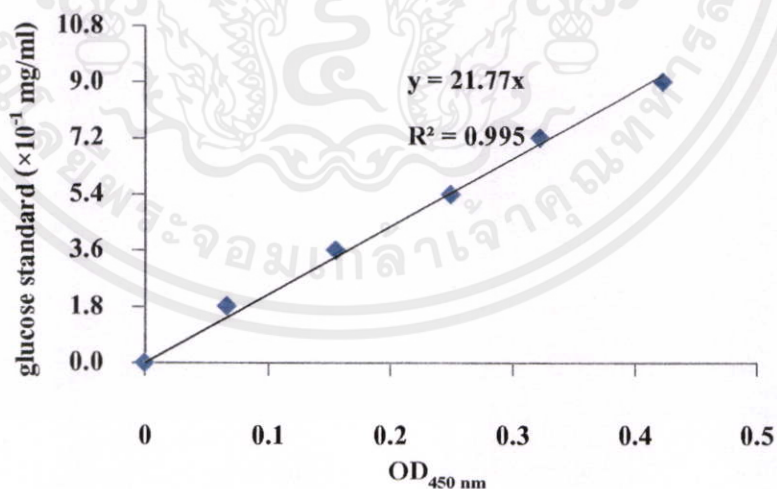
## 9.2 การทดสอบตัวอย่าง

ปีเปิดตัวอย่างน้ำอ้อย 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปีเปิดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำ DNS reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที เมื่อเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากสมการจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

$$y = 21.77x$$

เมื่อ  $y =$  ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)  
 $x =$  ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



ภาพที่ ค4 กราฟมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 10. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทด้วยวิธี Soxhlet's modification of Fehling's solution (Bogdanov, 2002)

### 10.1 การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ปิเปตตวงขนาด 25 มิลลิลิตร คูตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ลงด้วยกระเบื้อง เดม น้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับให้เป็นกลางด้วย 1N NaOH โดยคำนวณปริมาตรของ 1N NaOH ที่ต้องใช้ จากค่าความเป็นกรดทั้งหมดของตัวอย่าง ระเหยบนอ่างระเหยให้ตัวอย่างเหลือเพียง 50 มิลลิลิตร แล้วถ่ายลงในขวดตวงปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เดม น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร และเติมสารละลายลีดอะซิเตท 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วคั่งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายโปตัสเซียมออกซาลเอท ในปริมาณที่เพียงพอที่จะตกตะกอนลีดอะซิเตทได้หมด เขย่าให้เข้ากัน เพื่อให้โปตัสเซียมออกซาลเอท จับกับลีดอะซิเตท (ให้ทำการทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมก่อน) เดม น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำมาไฮโดรไลซ์โดยใช้ปิเปตตวงสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก 5 กรัมและน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย จากนั้นต้มให้เดือดเบาๆ นาน 10 นาที ทำให้เป็นกลางด้วย 1N NaOH โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ถ่ายใส่ขวดตวงปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

### 10.2 การไทเทรตเพื่อหาจุดยุติขั้นต้น

กรณีที่ไม่ทราบว่ามีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเท่าไร ให้ทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารละลายที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลายซอคท์เล่ท์ที่ใช้คร่าว ๆ ก่อน โดยตวงสารละลายซอคท์เล่ท์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุสารละลายตัวอย่างลงในบิวเรต เติมสารละลายตัวอย่าง 15 มิลลิลิตร ลงในสารละลายซอคท์เล่ท์ วางขวดบนเตาไฟฟ้า ปรับระดับความร้อนของเตาไฟฟ้าให้สารละลายเดือดปานกลางภายในเวลา 2 นาที เมื่อสารละลายเดือดแล้วเกิดตะกอนสีแดงอิฐแต่สารละลายยังมีสีฟ้าแสดงว่ายังไม่ถึงจุดยุติให้ไทเทรตโดยเติมสารละลายตัวอย่างครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร จนสีฟ้าของสารละลายหายไป แล้วเติมเมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ 3-4 หยด ไทเทรตเช่นเดิมต่อไปจนเกือบถึงจุดยุติ แล้วจึงไทเทรตทีละหยดจนถึงจุดยุติซึ่งสีฟ้าของสารละลายหายไป (หรือสังเกตจากสีฟ้าในฟองของสารละลายที่กำลังเดือดหายไป) และได้ตะกอนสีแดงอิฐ ให้ใช้เวลาในการไทเทรตต่อไปให้ถึงจุดยุติภายใน 1 นาที รวมเวลาที่ใช้ในการไทเทรตตั้งแต่เริ่มให้ความร้อนจนถึงจุดยุติไม่ควรเกิน 3 นาที แต่ถ้าเมื่อสารละลายเดือดแล้วเกิดตะกอนสีแดงอิฐแต่สารละลายไม่มีสีและเติมเมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ 3-4 หยด แล้วสีของเมทิลีนบลูหายไป แสดงว่าเกินจุดยุติให้เจือจางสารละลายที่ใช้ไทเทรตลงอีก ถ้าถึงจุดยุติที่ปริมาณมากกว่า 50 มิลลิลิตร ให้ใช้สารละลายที่ใช้ไทเทรตที่มีความเข้มข้นมากขึ้น

เอกสารนี้เป็น  
ไม่ว่ากรณีใด

\*หมายเหตุ ถ้าไทเทรตได้จุดยุติมีปริมาตรในช่วงตั้งแต่ 15 มิลลิลิตร จนถึง 50 มิลลิลิตร ภายในเวลา 3 นาที ให้ทำซ้ำอีกจนได้ค่าที่เที่ยงตรง

ให้ใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานในการไทเทรตกับสารละลายซอคค์์เล็ท 25 มิลลิลิตรจนถึงจุดยุติในปริมาตรที่อยู่ในช่วงตั้งแต่ 15 มิลลิลิตร ถึง 50 เพื่อเป็นค่ามาตรฐานในการคำนวณปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท

### 10.3 การไทเทรตเพื่อหาปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทในตัวอย่าง

เจือจางสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 10.1 บรรจุสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงในบิวเรต จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างลงในฟลาสก์ที่บรรจุสารละลายซอคค์์เล็ท 15 มิลลิลิตร ทำการไทเทรตต่อเช่นเดียวกับข้อ 10.2 จำนวนปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเทียบจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารละลายซอคค์์เล็ท 25 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

สารละลายมาตรฐานซอคค์์เล็ท 25 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลายซูโครสมาตรฐาน a มิลลิลิตร (ซึ่งมีปริมาณซูโครส  $0.095 \times a$  กรัม)

ดังนั้น หากสารละลายมาตรฐานซอคค์์เล็ท 25 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลายตัวอย่าง b มิลลิลิตร แสดงว่ามีซูโครส  $0.095 \times a$  กรัม

ถ้าสารละลายตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท

$$\text{ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท (กรัม)} = \frac{0.095(a) \times 100}{b}$$

## 11. การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ (Leasing และ Karraphan, 2011)

สูตรการคำนวณค่าของพารามิเตอร์ต่าง ๆ มีดังนี้

### 11.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, $\mu$ )

$$\text{Specific growth rate, } \mu = \frac{\ln(x_t - x_0)}{t}$$

เมื่อ  $x_t$  คือปริมาณเชื้อที่เวลา t

$x_0$  คือปริมาณเชื้อที่เวลาเริ่มต้น

t คือระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะในโครงการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 11.2 สัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ (Cell yield coefficient, $Y_{X/S}$ )

$$\text{Cell yield coefficient, } Y_{X/S} = \frac{\text{dry biomass}}{\text{substrate consumption}}$$

### 11.3 ปริมาณผลผลิตต่อการใช้สับสเตรท (Process product yield, $Y_{P/S}$ )

$$\text{Process product yield, } Y_{P/S} = \frac{\text{total lipid}}{\text{substrate consumption}}$$

### 11.4 ปริมาณผลผลิตจำเพาะ (Specific yield of lipid, $Y_{P/X}$ )

$$\text{Specific yield of lipid, } Y_{P/X} = \frac{\text{total lipid}}{\text{dry biomass}}$$

### 11.5 อัตราการใช้สับสเตรท (Volumetric rate of substrate consumption, $Q_s$ )

$$\text{Volumetric rate of substrate consumption, } Q_s = \frac{\text{substrate consumption}}{\text{time}}$$

### 11.6 อัตราการผลิตน้ำหนักแห้ง (Volumetric cell mass production rate, $Q_x$ )

$$\text{Volumetric cell mass production rate, } Q_x = \frac{\text{dry biomass}}{\text{time}}$$

### 11.7 อัตราการผลิตลิพิด (Lipid production rate, $Q_p$ )

$$\text{Lipid production rate, } Q_p = \frac{\text{total lipid}}{\text{time}}$$

### 11.8 อัตราการใช้สับสเตรทจำเพาะ (Specific rate of substrate consumption, $q_s$ )

$$\text{Specific rate of substrate consumption, } q_s = \frac{\text{substrate consumption}}{\text{dry biomass} \times \text{time}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 11.9 อัตราการผลิตลิพิดจำเพาะ (Specific rate of lipid production,  $q_p$ ) ใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกไปเผยแพร่ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

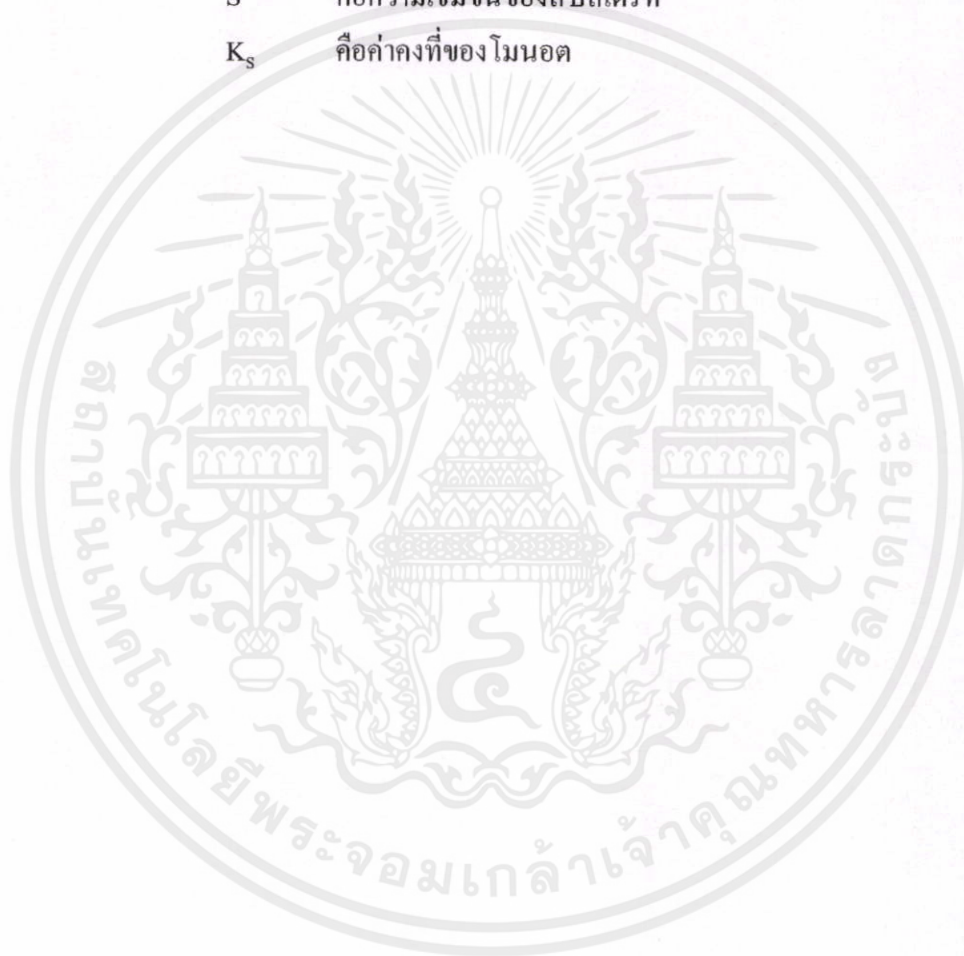
$$\text{Specific rate of lipid production, } q_p = \mu \cdot Y_{P/X}$$

### 11.10 ค่าคงที่ของโมนอด (Monod's constant, $K_s$ )

คำนวณได้จากสมการ โมนอด

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S}$$

เมื่อ	$\mu$	คืออัตราการเจริญจำเพาะ
	$\mu_{\max}$	คืออัตราการเจริญสูงสุด ( $\mu = 0.5 \mu_{\max}$ )
	S	คือความเข้มข้นของสับสเตรท
	$K_s$	คือค่าคงที่ของโมนอด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ผลการทดลอง

ตารางที่ ๑ ปริมาณลิวินและน้ำหนักแห้งของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ที่สภาวะต่างๆ

ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท (g/100 ml น้ำอ้อย)	C:N	ปริมาณลิวินภายใน เซลล์ (g/100 g)	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณลิวิน ทั้งหมด (g/l)
2.01	60:1	27.81 <sup>a,B</sup>	4.38 <sup>b,H</sup>	1.21 <sup>a,CDE</sup>
	60:2	24.91 <sup>b,C</sup>	6.07 <sup>a,CDE</sup>	1.51 <sup>a,BC</sup>
	60:3	21.79 <sup>c,D</sup>	6.76 <sup>a,ABC</sup>	1.47 <sup>a,BC</sup>
	60:4	19.89 <sup>c,E</sup>	7.28 <sup>a,A</sup>	1.44 <sup>a,BC</sup>
5.09	60:1	40.30 <sup>a,A</sup>	6.43 <sup>a,BCD</sup>	2.59 <sup>a,A</sup>
	60:2	25.30 <sup>b,C</sup>	7.20 <sup>a,AB</sup>	1.82 <sup>ab,B</sup>
	60:3	17.03 <sup>c,GH</sup>	4.94 <sup>b,GH</sup>	0.84 <sup>c,EF</sup>
	60:4	17.04 <sup>c,GH</sup>	6.42 <sup>a,BCD</sup>	1.09 <sup>ab,CDEF</sup>
8.19	60:1	22.12 <sup>a,D</sup>	6.78 <sup>a,ABC</sup>	1.50 <sup>a,BC</sup>
	60:2	19.86 <sup>b,E</sup>	6.99 <sup>a,AB</sup>	1.38 <sup>a,CD</sup>
	60:3	16.68 <sup>c,GHI</sup>	4.56 <sup>b,GH</sup>	0.76 <sup>b,F</sup>
	60:4	18.48 <sup>d,F</sup>	4.75 <sup>b,GH</sup>	0.87 <sup>b,EF</sup>
12.28	60:1	16.01 <sup>c,HI</sup>	6.10 <sup>a,CDE</sup>	0.97 <sup>b,DEF</sup>
	60:2	19.09 <sup>a,EF</sup>	5.88 <sup>b,DEF</sup>	1.12 <sup>a,CDEF</sup>
	60:3	17.85 <sup>b,FG</sup>	5.17 <sup>c,FG</sup>	0.92 <sup>bc,EF</sup>
	60:4	15.52 <sup>d,I</sup>	5.38 <sup>d,FG</sup>	0.83 <sup>c,EF</sup>
16.79	60:1	13.63 <sup>b,J</sup>	6.01 <sup>c,CDE</sup>	0.82 <sup>b,EF</sup>
	60:2	15.53 <sup>a,I</sup>	4.70 <sup>d,GH</sup>	0.73 <sup>c,F</sup>
	60:3	12.18 <sup>c,K</sup>	6.65 <sup>b,ABCD</sup>	0.81 <sup>b,EF</sup>
	60:4	11.96 <sup>c,K</sup>	7.06 <sup>a,AB</sup>	0.84 <sup>a,EF</sup>

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย (ทดลอง 3 ซ้ำ) วิเคราะห์ความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

abcd อักษรกำกับแตกต่างกันในคอลัมน์ที่ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  
 ABCDEFGH อักษรกำกับแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ ๖2 ปริมาณลิพิดและน้ำหนักแห้งของยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลาการหมัก (hr.)	ปริมาณลิพิดภายในเซลล์ (g/100 g)	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณลิพิดทั้งหมด (g/l)
10	240	22.58 <sup>E</sup>	2.98 <sup>C</sup>	0.67 <sup>D</sup>
15	240	43.48 <sup>BC</sup>	2.07 <sup>D</sup>	0.90 <sup>D</sup>
20	192	55.50 <sup>A</sup>	6.85 <sup>A</sup>	3.80 <sup>A</sup>
25	192	42.00 <sup>CD</sup>	5.59 <sup>B</sup>	2.35 <sup>C</sup>
30	144	45.05 <sup>B</sup>	7.10 <sup>A</sup>	3.20 <sup>AB</sup>
35	144	40.30 <sup>D</sup>	6.43 <sup>A</sup>	2.59 <sup>BC</sup>

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย (ทดลอง 3 ซ้ำ) วิเคราะห์ความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

<sup>ABCD</sup> อักษรกำกับแตกต่างกันในคอลัมน์นี้แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ ๖3 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในตัวอย่างลิพิดจากยีสต์น้ำมัน *Rhodospiridium toruloides* TISTR 5123

ชนิดของกรดไขมัน	ปริมาณร้อยละกรดไขมัน					
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
Myristic acid 14:0	2.76	3.53	3.91	4.91	4.35	5.90
Palmitic acid 16:0	29.63	29.63	34.22	42.84	37.01	43.47
Palmitoleic acid 16:1	16.66	15.94	12.36	7.69	10.75	5.89
Stearic acid 18:0	2.13	1.35	2.50	5.03	2.60	6.54
Oleic acid 18:1	26.84	18.06	18.75	18.73	15.96	13.79
Linoleic acid 18:2	6.6	5.19	ND	3.15	ND	3.75

ND คือไม่สามารถตรวจวัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ค่าจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ในถังหมักแบบกวน ขนาด 5 ลิตร

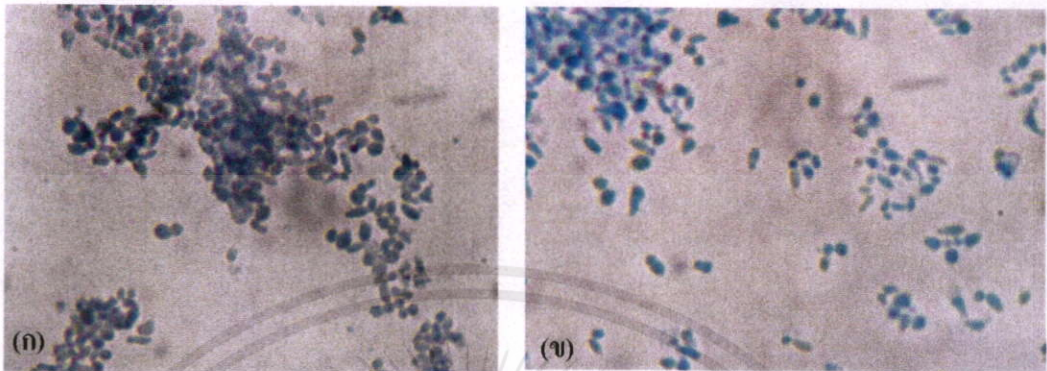
ระยะเวลา (hr.)	พีเอช	ลิกนินในเซลล์ (g/100 g)	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณลิกนินทั้งหมด (g/l)	ปริมาณเซลล์ (log CFU)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)
0	5.72	0	0	0	6.93	47.66
48	5.82	ND	ND	ND	7.71	51.76
96	5.89	6.84	6.38	6.38	8.87	33.08
144	5.84	24.79	8.61	8.61	11.44	13.91
192	6.01	49.38	8.97	8.97	11.93	5.37

หมายเหตุ : ND คือไม่ได้ทำการตรวจวัด

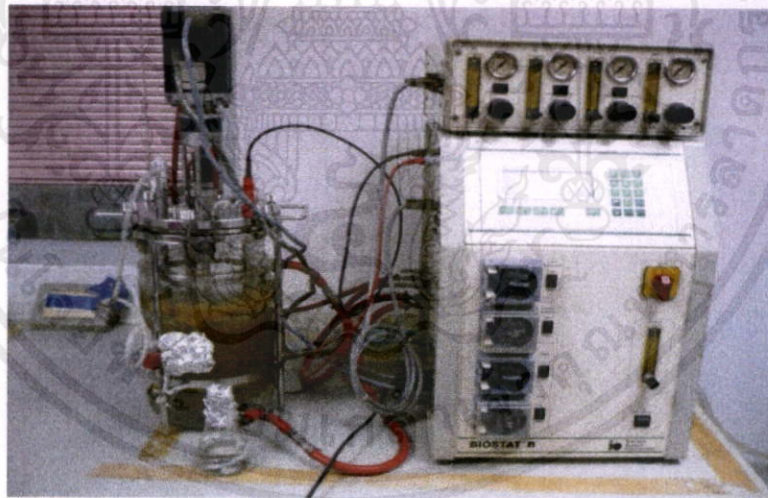


ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YM (ข) ภาพเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่าที่เลี้ยงในอาหารแข็ง YM เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

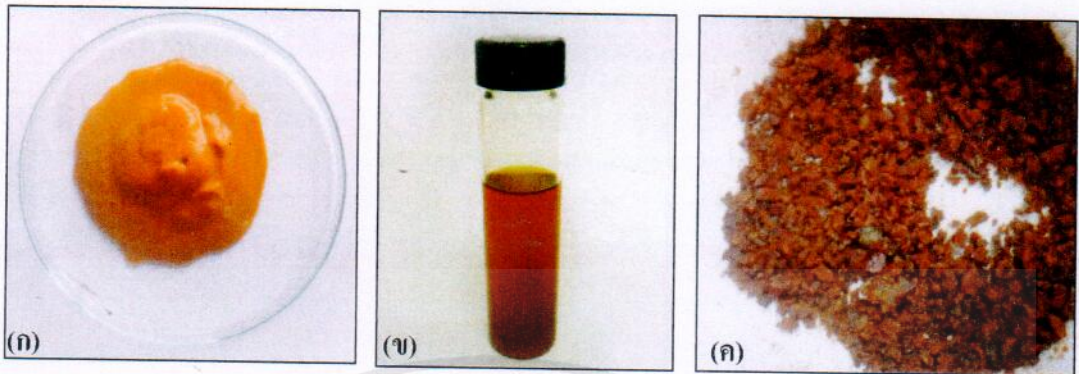


ภาพที่ ๑๒ ลักษณะของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง (ก) ภาพเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่าที่ย้อมด้วยสี sudan black (ข) ภาพเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่าที่ย้อมด้วยเมทิลีนบลู



ภาพที่ ๑๓ การเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ในถังหมักแบบกวน ขนาด 5 ลิตร ปริมาตรอาหาร 3.5 ลิตร ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทเริ่มต้นร้อยละ 5.09 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ๔ ลิพิดที่ได้จาก *Rhodosporidium toruloides* TISTR 5123 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 192 ชั่วโมง (ก) เซลล์ยีสต์สด (ข) ตัวอย่างลิพิด (ค) เซลล์ยีสต์แห้งที่อบภายใต้ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวช่อทิพย์ เรืองอุดม
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 22 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2530
ที่อยู่	51/80 ถนนรังสิตนครนายก ตำบลบึงขัง อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12130
	โทรศัพท์ : 084-1306889, e-mail : chocolate_joy@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	2552 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
	2552 เข้าศึกษาคณะระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานตีพิมพ์	Ruangudom, C. and Pungpeng, B. 2011. Effect of C/N ratio and temperature on lipid accumulation of <i>Rhodospiridium toruloides</i> TISTR 5123 using sugar cane juice. The 12th ASEAN FOOD CONFERENCE. 612-616.

\*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้