# การคัดเลือกสายพันธุ์และสภาวะการเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงที่ย่อยแป้งได้เพื่อผลิตไขมันเซลล์เดี่ยวจากแป้งมันสำปะหลัง

# SELECTION AND CULTIVATION OF AMYLOLYTIC OLEAGINOUS YEAST STRAIN FOR SINGLE CELL OIL PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH

บำเพ็ญ นิ่มเขียน
BUMPEN NIMKIAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2545
ISBN 974-648-817-1

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การคัดเลือกสายพันธุ์และสภาวะการเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงที่ย่อยแป้งได้เพื่อผลิตไขมันเซลล์เดี่ยวจากแป้งมันสำปะหลัง

# SELECTION AND CULTIVATION OF AMYLOLYTIC OLEAGINOUS YEAST STRAIN FOR SINGLE CELL OIL PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH

บำเพ็ญ นิ่มเขียน
BUMPEN NIMKIAN

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43713
วัน, เดือน, ปี 30 ก.ย. 2545

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2545

ISBN 974-648-817-1

# SELECTION AND CULTIVATION OF AMYLOLYTIC OLEAGINOUS YEAST STRAIN FOR SINGLE CELL OIL PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH

BUMPEN NIMKIAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2002

ISBN 974-648-817-1

COPYRIGHT 2002
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การคัดเลือกสายพันธุ์และสภาวะการเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงที่ย่อยแป้งได้เพื่อผลิตไขมันเซลล์เดี่ยวจากแป้งมันสำปะหลัง |
| **นักศึกษา** | นางสาวบำเพ็ญ นิ่มเขียน |
| **รหัสประจำตัว** | 40066001 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | วิทยาศาสตร์การอาหาร |
| **พ.ศ.** | 2545 |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์** | ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม** | ผศ. ดร. ระติพร หาเรือนกิจ |

## บทคัดย่อ

การทดลองแยกเชื้อยีสต์ไขมันสูงจากดินตัวอย่าง แยกได้เชื้อยีสต์ทั้งหมด 620 เชื้อ คัดเลือกได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมันสูงสุดคือเชื้อรหัส TD-4 เมื่อนำไปทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันจากแป้งมันสำปะหลัง โดยศึกษาถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิต ผลของอุณหภูมิและอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ได้ว่าที่ระยะเวลาในการผลิตที่ 6 วัน อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 จะให้การผลิตดีที่สุด โดยได้ปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 60.30 โดยน้ำหนักแห้ง การเติมไทอะมินในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร แมงกานีสคลอไรด์ในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร ซิงค์คลอไรด์ในอัตรา 1.0 กรัมต่อลิตรไบโอตินในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร และแมงกานีสคลอไรด์ในอัตรา 1.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 68.61 ร้อยละ 65.75 ร้อยละ 65.44 ร้อยละ 64.53 และร้อยละ 62.64 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นไขมันได้เท่ากับ 18.42 กรัมไขมันต่อแป้งที่ถูกใช้ไป 100 กรัม ไขมันสกัดหยาบที่ได้มีคุณสมบัติทางเคมีคือ ค่าไอโอดีนเท่ากับ 52.3 กรัมต่อ100 กรัมไขมัน ค่าซาพอนนิฟิเคชันเท่ากับ 189 มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน ค่าเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 7 มิลลิสมมูลต่อกิโลกรัมและค่าของกรดเท่ากับ 6 มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน องค์ประกอบหลักของไขมันประกอบด้วยกรดปาลมิติคร้อยละ 20.61 กรดสเตียริคร้อยละ 17.76 กรดโอเลอิคร้อยละ 34.35 และกรดลิโนเลอิคร้อยละ 17.00 ของปริมาณไขมันทั้งหมดของเซลล์ยีสต์ ไขมันที่ได้เป็นไขมันชนิดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่มากกว่าร้อยละ 50

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Selection and Cultivation of Amylolytic Oleaginous Yeast Strain for Single Cell Oil Production from Cassava Starch |
| Student | Miss Bumpen Nimkian |
| Student ID. | 40066001 |
| Degree | Master of Science |
| Programme | Food Science |
| Year | 2002 |
| Thesis advisor | Dr. Boontiam Punpeng |
| Thesis co-advisor | Assist. Prof. Dr. Ratiporn Haruenkit |


## ABSTRACT

An amylolytic oleaginous yeast strain TD-4 was selected as a potent strain for oil production from cassava starch, among 620 yeast strains isolated from soil.The optimum cultivation conditions of this strain on cultivation time, temperature and C/N ratio were 6 days, 15 degree celsius and 60:1 respectively, which produced lipid of 60.30% by dry cell weight. The addition of thiamine-HCl, 0.5 g/l, manganese chloride 0.5 g/l, zinc chloride 1.0 g/l, biotin 0.5 g/l and manganese chloride 1.0 g/l could increase the lipid content in yeast cell to 68.61% 65.755% 65.44% 64.53% and 62.64% by dry cell weight respectively.The single cell oil production efficiency from cassava starch by this strain was 18.42 g/100g starch.The chemical properties of crude oil which was extracted by hexane were iodine value 52 3 gram/100 gram lipild, saponification value 189 milligram KOH/gram lipid, peroxide value 7 milliequivalent/kg. and acid value 6 milligram KOH/ gram lipid.The major fatty acid profile of this crude oil was palmitic acid (C16:0) 20.61% stearic acid (C18:0) 17.76% oleic acid (C18:1) 34.35% and linoleic acid (C18:2) 17.00%.These results showed that this yeast strain could produced single cell oil which contained unsaturated fatty acid more than 50% of total oil content in the cell.

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง ที่ได้ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รวมทั้งกรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น และคำแนะนำอันมีค่าและเป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้าตลอดมาในการทำวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ระติพร หาเรือนกิจ ที่ได้ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม อีกทั้งให้คำแนะนำเพิ่มเติมแก่ข้าพเจ้า ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. พอใจ ถามากร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ได้ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการ และช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ ที่ให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ครูบาอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

บำเพ็ญ นิ่มเขียน

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญรูป.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....2

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....2

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1ไขมันในจุลินทรีย์.....3

2.1.1 สาหร่าย.....6

2.1.2 แบคทีเรีย.....6

2.1.3 ราและยีสต์.....7

2.2 การคัดเลือกยีสต์.....10

2.2.1 การใช้ elective media.....11

2.2.2 การใช้ selective media.....11

2.3 ลักษณะของไขมันจากยีสต์ไขมันสูง.....12

2.3.1 กลีเซอไรด์.....13

2.3.2 ฟอสโฟลิปิด.....15

2.3.3 ไฮโดรคาร์บอน.....16

2.3.4 สฟิงโกลิปิด.....16

2.3.5 สเตียรอยด์.....17

2.4 การผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูง.....17

2.4.1การสังเคราะห์ไขมัน.....17

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


2.4.2 กลไกการควบคุมการเมแทบอลิซึมของไขมัน....25
2.5 ข้อดีของการใช้ยีสต์เป็นแหล่งไขมัน....27
2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูง....28
2.6.1 อัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนของสับสเตรท....29
2.6.2 แหล่งคาร์บอน....30
2.6.3 แหล่งไนโตรเจน....33
2.6.4 อุณหภูมิ....34
2.6.5 ความเป็นกรด-ด่าง....36
2.6.6 ปริมาณออกซิเจน....36
2.6.7 ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต....36
2.7 การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตไขมันโดยใช้ยีสต์ไขมันสูง....37
2.8 การสกัดและวิเคราะห์กรดไขมันในเซลล์ยีสต์ไขมันสูง....38
2.8.1 วิธีการสกัดไขมันและกรดไขมัน....38
2.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน....39
2.8.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของไขมัน....42

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย....45
3.1 อุปกรณ์....45
3.2 สถานที่ทำการทดลอง....45
3.3 วิธีการดำเนินงาน....45
3.3.1 การเก็บตัวอย่าง....45
3.3.2 การแยกเชื้อยีสต์และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์....46
3.3.3 ศึกษาความสามารถในการผลิตไขมัน....47
3.5.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมัน....48
3.4.5 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของไขมันที่ได้....48
3.4.6 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของกากเซล์ที่เหลือจากการสกัดไขมัน....51
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์....49
4.1 แหล่งดินตัวอย่าง....49
4.2 การแยกเชื้อยีสต์และการทำให้บริสุทธิ์....49

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


4.3 การศึกษาความสามารถในการผลิตไขมันของยีสต์ที่คัดเลือกได้.....51

4.4 การศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการผลิตไขมันของเชื้อรหัส TD-4.....53

4.4.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิต.....53

4.4.2 ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนและอุณหภูมิที่เหมาะสม.....54

4.4.3 ศึกษาผลของการเติมวิตะมิน โปตัสเซียมไซยาไนด์ และแคตอิออน.....60

4.4.4 ศึกษาผลของการสกัดไขมันด้วยเฮกเซนโดยใช้ soxhlet apparatus.....63

4.5 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของไขมันที่ได้.....64

4.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่เหลือจากการสกัดไขมัน.....68

4.7 การวิเคราะห์ผลิตผล.....69

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง .....70

ข้อเสนอแนะ.....71

บรรณานุกรม.....72

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....80

ภาคผนวก ข น้ำยาเคมี.....82

ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์.....83

ภาคผนวก ง ตารางผลการทดลอง.....91

ภาคผนวก จ โครมาโตแกรมของกรดไขมัน.....93

ประวัติผู้เขียน.....95

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงกรดไขมันสามัญ.....5

2.2 ชนิดของจุลินทรีย์ไขมันสูงซึ่งสามารถผลิตไขมันได้ร้อยละ 40-80 โดยน้ำหนักแห้ง.....8

2.3 ยีสต์ไขมันสูง.....9

2.4 ปริมาณไขมันในยีสต์ที่ไม่ใช่ยีสต์ไขมันสูง.....10

2.5 องค์ประกอบของไขมันในยีสต์ไขมันสูงบางสายพันธุ์.....13

2.6 กรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูง.....14

2.7 เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับไขมันจากพืชน้ำมัน.....15

2.8 ปริมาณไขมันที่สกัดได้จาก *Candida curvata*.....39

2.9 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันบางชนิด.....45

4.1 แหล่งดินตัวอย่างและจำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้และจำนวนยีสต์ที่ย่อยแป้งได้.....50

4.2 ปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส T4 –4.....52

4.3 ปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 เมื่อเติมวิตามิน โปตัสเซียมไซยาไนด์และแคตอิออน.....61

4.4 คุณสมบัติทางเคมีของไขมันจากยีสต์รหัส TD4.....67

# สารบัญรูป


รูปที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างของกลีเซอไรด์....13

2.2 สูตรทั่วไปของฟอสโฟลิปิดชนิดต่าง ๆ....16

2.3 สูตรโครงสร้างทั่ว ๆไปของสเตียรอยด์....17

2.4 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์จากคาร์โบไฮเดรต....18

2.5 การนำอะซิติลโค-เอจากไมโตคอนเดรียออกสู่ไซโตพลาสซึมเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน....19

2.6 การสังเคราะห์กรดไขมันในไซโตพลาสซึม....20

2.7 การสังเคราะห์ unsaturated fatty acid ชนิด $\omega_9$....22

2.8 การสังเคราะห์ unsaturated fatty acid ชนิด $\omega_6$....23

2.9 การสังเคราะห์ unsaturated fatty acid ชนิด $\omega_3$....24

2.10 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์....25

4.1 ปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4ที่ระยะเวลาต่าง ๆ....53

4.2 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัสTD4ที่อุณหภูมิ10องศาเซลเซียส....55

4.3 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัสTD-4 ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส....56

4.4 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัสTD4ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส....57

4.5 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 ที่อุณหภูมิห้อง (32องศาเซลเซียส)....58

4.6 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส....59

4.7 แสดงรูปหยดไขมันภายในเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4....68

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันนี้ความต้องการใช้น้ำมันและไขมันในอุตสาหกรรมอาหารได้เพิ่มสูงขึ้น การมองหาแหล่งน้ำมันและไขมันแหล่งใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นไขมันทดแทนไขมันจากพืชที่มีราคาแพง เช่น ใช้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ นับว่ามีความสำคัญและเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง การผลิตไขมันจากจุลินทรีย์เป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจอีกแหล่งหนึ่ง จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย สามารถผลิตไขมันได้ ซึ่งจะเรียกจุลินทรีย์ประเภทนี้ว่า"จุลินทรีย์ไขมันสูง" (oleaginous microorganism) ไขมันที่ได้จะเรียกว่า "ไขมันเซลล์เดี่ยว" (single cell oil , SCO) องค์ประกอบหลักของไขมันประมาณร้อยละ 95 ของไขมันที่ได้จะเป็นไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายไขมันจากพืช ที่เหลือก็จะเป็นไขมันอื่น ๆ เช่น ฟอสโฟลิปิด เป็นต้น ไขมันจากจุลินทรีย์สามารถพัฒนาเป็นแหล่งไขมันทดแทนน้ำมันพืช เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วลิสง ไขมันทดแทนเนยโกโก้ ใช้เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งมีประโยชน์นำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง ใช้เป็นแหล่งผลิตสารสเตียรอยด์ ใช้เป็นแหล่งของน้ำมันที่มีกรดแกมม่าลิโนเลนิคสูง และเซลล์ที่เหลือจากการสกัดไขมันยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อ เช่น ใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยวในอาหารสัตว์ทดแทนแหล่งโปรตีนจากพืชที่ต้องใช้พื้นที่และต้นทุนในการผลิตสูง เป็นต้น (Ratledge. 1981)

แต่การผลิตไขมันจากจุลินทรีย์ก็ยังไม่สามารถทำการผลิตเป็นอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากปัญหาเรื่องต้นทุนการผลิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตน้ำมันจากพืชน้ำมัน เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหานี้จึงสนใจศึกษาการผลิตไขมันจากยีสต์โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากยีสต์นับว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตไขมันสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย รา และสาหร่าย ในขณะเดียวกันแป้งมันสำปะหลังก็ถือเป็นวัตถุดิบที่ราคาถูกและหางายจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยพัฒนาการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์ได้ และนอกจากนี้ก็ยังอาจจะเป็นแนวทางที่จะช่วยเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรที่มีราคาตกต่ำ เช่น มันสำปะหลังนี้ให้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้นได้ หรืออาจจะเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการบำบัดของเหลือทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังได้

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาคัดเลือกยีสต์ไขมันสูงที่ย่อยแป้งได้มาผลิตเป็นไขมันเซลล์เดี่ยวจากแป้งมันสำปะหลัง

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตไขมันของยีสต์ไขมันสูงที่ย่อยแป้งได้

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ต้องการคัดเลือกยีสต์ไขมันสูงที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทได้

## 1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 คัดเลือกได้ยีสต์ไขมันสูงที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมันเซลล์เดี่ยวจากแป้งมันสำปะหลัง

1.4.2 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเป็นแนวทางการผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูงจากแป้งมันสำปะหลัง

# บทที่ 2
# งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ไขมันในจุลินทรีย์

ไขมันและน้ำมันเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่พบในไขมันอย่างง่ายและไขมันเชิงประกอบ กรดไขมันทุกตัวประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน สูตรทั่วไปคือ $CH_3(CH_2)_nCOOH$ n มีค่าตั้งแต่ 2-24 โดยทั่วไปคาร์บอนอะตอมมักเป็นเลขคู่ คือ ตั้งแต่ 2 เป็นต้นไป อาจแบ่งกรดไขมันตามความต้องการของร่างการได้เป็น 2 ประเภท คือ กรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) และกรดไขมันไม่จำเป็น (non essential fatty acid) กรดไขมันจำเป็นหมายถึงกรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองต้องได้รับจากอาหารเท่านั้นและถ้าร่างกายขาดแคลนอาจทำให้เกิดอันตรายได้ กรดไขมันจำเป็นมี 2 ตระกูลคือ ตระกูลลิโนเลอิค (linoleic ;18:2 n-6) และตระกูลลิโนเลนิค (linolenic;18:3 n-3) กรดไขมันจำเป็นทั้ง 2 ตระกูลนี้จำเป็นต้องใช้เพื่อการสังเคราะห์กรดไขมันอื่น ๆ และสารที่จำเป็นต่อร่างกายโดยไม่มีการสร้างทดแทนข้ามตระกูล คือตระกูลลิโนเลอิคนำไปสร้างกรดไดโฮโมแกมม่าลิโนเลนิค (dihomo gamma-linolenic acid;20:3 n-6;GLA) กรดอาราชิโดนิค (arachidonic acid;20:4 n-6;AA) และกรดแอดเรนิค (adrenic acid;22:5 n-6) ส่วนตระกูลลิโนเลนิคนำไปสร้างกรดอิโคซาเพนตะอีโนนิค (eicosapentaenoic acid;20:5 n-3;EPA) กรดโดโคซาเพนตะอีโนอิค (docosapentaenoic acid;22:5 n-3;DPA) และกรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิค (docosahexaenoic acid;22:6 n-3;DHA) กรดไขมันจำเป็นทำหน้าที่ คือ เป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์และออแกเนล (organelle) ต่าง ๆ ควบคุมการเมแทบอลิซึมของลิโปโปรตีนทำให้สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดซึ่งจะช่วยลดภาวะหลอดเลือดแข็งและหัวใจขาดเลือด และยังเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารพรอสตาแกลนดินส์ (prostaglandins) ซึ่งเป็นสารคล้ายฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น การหลั่งกรดเกลือในกระเพาะอาหาร การหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบของอวัยวะภายใน การควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย การรวมตัวของแผ่นเลือด เป็นต้น กรด EPA และกรด DHA ยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและรักษาอาการอักเสบต่าง ๆ และโรคมะเร็งบางชนิด กรด DHA เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อสมองและเซลล์ประสาท เป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยในการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อสมองในเด็กทารก ช่วยป้องกันอาการพิการทางสมองรวมถึงโรคอัลไซเมอร์ (alzheimer disease) แหล่งของกรด DHA ที่สำคัญคือ น้ำนมแม่ซึ่งมีมากกว่านมโคถึง 30 เท่า โดยแหล่งของกรด DHA และกรด EPA ในเชิงพาณิชย์คือ น้ำมันปลา (fish oil) เช่น ปลาเมนฮาเดน (menhaden) ปลาเฮอริ่ง (herring) และปลาคอด (cod) และแหล่งธรรมชาติอื่น ๆ เช่น ตับ

ไต เมล็ดพืชบางชนิด แต่ปริมาณยังไม่เพียงพอต่อความต้องการจึงได้มีการค้นหาจากแหล่งอื่น ๆ มาทดแทน ซึ่งพบว่าแหล่งจากจุลินทรีย์กำลังได้รับความสนใจ (Ward. 1995) เนื่องจากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถให้การผลิตไขมันได้ โดยไขมันที่ได้จากจุลินทรีย์จะเรียกว่า "ไขมันเซลล์เดี่ยว" ซึ่งมักเป็นไขมันที่บริโภคได้ (edible oil) มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับไขมันจากพืช องค์ประกอบหลัก คือ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ซึ่งจะอยู่ในรูปหยดน้ำมันเล็ก ๆ ภายในเซลล์ (microdroplet oil) จุลินทรีย์ที่ผลิตไขมันได้จะเรียกว่าเป็น "จุลินทรีย์ไขมันสูง" (oleaginous microorganisms) โดยไขมันที่ผลิตได้ต้องมีปริมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้งขึ้นไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตไขมันได้สูงถึงร้อยละ 70 โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนจุลินทรีย์ที่สะสมไขมันภายในเซลล์แล้วให้ปริมาณไขมันน้อยกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง จะเรียกว่าเป็น "จุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง"(non-oleaginous microorganism) (Ratledge and Evans. 1989) และพบว่าจุลินทรีย์ไขมันสูงจะมีเอนไซม์ ATP : citrate lyase ซึ่งต้องการ ATP และ $Mg^{2+}$ โดยอาจใช้ $Co^{2+}$ หรือ $Mn^{2+}$ แทน $Mg^{2+}$ ได้บางส่วน ADP จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ATP : citrate lyase ได้เช่นเดียวกับ long chain fatty acid acyl-CoA ester ATP : citrate lyase พบได้ทั้งในพืชและในสัตว์ แต่จะไม่พบเอนไซม์นี้ในจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ไขมันสูง (Boulton and Ratledge. 1981 ; Evans and Ratledge.1983) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันในปริมาณสูง ๆ นั้นมีทั้งยีสต์ รา สาหร่าย และแบคทีเรีย (King and Cheetham. 1988)

การเรียกชื่อกรดไขมันโดยทั่วไปที่ใช้กันบ่อย ๆ มักมีการเรียกตาม Genevan system คือ เรียกกรดไขมันตามจำนวนคาร์บอนอะตอม กรดไขมันอิ่มตัวใช้ –oic แทนอักษร e ตัวสุดท้ายของไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นกรดไขมันอิ่มตัวจะลงท้ายด้วย –anoic เช่น octadecanoic acid ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่จะลงท้ายด้วย –enoic เช่น octadecaenoic acid ส่วนการให้หมายเลขหรืออักษรประจำของคาร์บอนอะตอมนั้น อาจให้ได้ทั้งจากทางด้านกลุ่ม carboxyl ซึ่งเป็นการเรียกการเรียกการให้ตัวเองแบบ $\Delta$ numbering หรือระบบอักษรกรีก (Greek lettering system) และยังอาจให้อักษรประจำคาร์บอนอะตอมตัวที่ไหลที่สุดจากกลุ่มคาร์บอกซิล เป็นแบบระบบหมายเลขแบบ n หรือ $\omega$ ดังเช่น

ปลาย $\omega$ $CH_3$ $CH_2$ $CH_2$ $CH_2$ $CH_2$ $CH_2$ $CH_2$ $CH_2$ $CH_2$ $COOH$ ปลาย carboxyl

การให้ตัวเลขแบบ $\Delta$ 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

การให้ตัวเลขแบบ n หรือ $\omega$ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

letter designation $\omega$ $\omega$-1 $\delta$ $\gamma$ $\beta$ $\alpha$

การใช้อักษรกรีกเพื่อชี้คาร์บอนอะตอมต่าง ๆ โดยคาร์บอนอะตอมตัว $\alpha$ จะติดอยู่กับกลุ่ม carboxyl หรือเป็นคาร์บอนอะตอมของกลุ่มสุดท้ายนั่นเองการเรียกชื่อกรดไขมันด้วยวิธี $\Delta$ numbering เป็นการเขียนจำนวนคาร์บอนอะตอมทั้งหมด : จำนวนของพันธะคู่และตำแหน่งของ

พันธะคู่เช่น กรดปาลมิโตเลอิค (palmitoleic acid ) จะเขียนแทนด้วย 16:1 $\Delta$9 ตัวเลขหลัง $\Delta$ใน ระบบการเขียนนี้ แสดงตำแหน่งของพันธะคู่ที่สัมพันธ์กับกลุ่ม carboxyl เช่นตัวอย่างข้างต้น นั่นคือ จะอยู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และที่10 โดยนับจากคาร์บอนอะตอมของกลุ่ม carboxyl เป็นตัวที่ 1

ส่วนในระบบการให้แบบ n หรือ $\omega$ จะเขียนกรดปาลมิโตเลอิค (palmitoleic acid) เป็น 16:1n-7 แสดงว่ากรดนี้มี 16 คาร์บอนอะตอมมี 1 พันธะคู่ที่ไม่อิ่มตัวโดยอยู่ที่คาร์บอนอะตอมที่ 7 เมื่อนับจากคาร์บอนอะตอมตัว $\omega$

เนื่องจากกรดปาลมิโตเลอิคมี16 คาร์บอนอะตอม ตัวพันธะคู่จึงอยู่ที่ตำแหน่งที่ 7นับจากคาร์บอนอะตอม $\omega$ ก็จะเป็นตำแหน่งที่ 9 จากคาร์บอนอะตอมของกลุ่ม carboxyl

กลุ่ม n-7 มีกรดไขมันที่เป็นตัวหลักคือ palmitoleic acid

กลุ่ม n-9 มีกรดไขมันที่เป็นตัวหลักคือ oleic acid

กลุ่ม n-6 มีกรดไขมันที่เป็นตัวหลักคือ linoleic acid

กลุ่ม n-3 มีกรดไขมันที่เป็นตัวหลักคือ linolenic acid

**ตารางที่** 2.1 แสดงกรดไขมันสามัญ

| ชื่อสามัญ (common name) | ชื่อตามระบบ (systematic name) | โครงสร้าง (structure) |
|---|---|---|
| กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) | | |
| Capric acid | n-decanoic acid | $CH_3(CH_2)_8COOH$ |
| Lauric acid | n-dodecanoic acid | $CH_3(CH_2)_{10}COOH$ |
| Mysristic acid | n- tetradecanoic acid | $CH_3(CH_2)_{12}COOH$ |
| Palmitic acid | n-hexadecanoic acid | $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ |
| Stearic acid | n-octadecanoic acid | $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ |
| Arachidic acid | n-eicosanoic acid | $CH_3(CH_2)_{18}COOH$ |
| Benhenic acid | n-docosanoic acid | $CH_3(CH_2)_{20}COOH$ |
| Lignoceric acid | n- tetracosanoic acid | $CH_3(CH_2)_{22}COOH$ |
| Corotic acid | n-hexacosanoic acid | $CH_3(CH_2)_{24}COOH$ |

**ตารางที่** 2.1 (ต่อ)

| กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) | | |
|---|---|---|
| Palmitoleic acid | cis-9 hexadecenoic acid | $CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$ |
| Oleic acid | cis-9 octadecenoic acid | $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$ |
| Linoleic acid | cis-9,12-octadecadeinoic acid | $CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=(CH_2)_7COOH$ |
| $\alpha$-Linolenic acid | All- cis-9,12,15-octadecatrienoic acid | $CH_3(CH_2)CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$ |

ที่มา : ปาน พิมพา (2522)

2.1.1 **สาหร่าย** (algae)

สาหร่ายเป็นแหล่งไขมันที่ดี สาหร่ายสามารถผลิตไขมันได้สูงถึงร้อยละ 85 โดยน้ำหนักแห้ง สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน แต่มีการเจริญเติบโตช้าต้องใช้แสงแดดและพื้นที่ในการเลี้ยง มีปัญหาในเรื่องการกำจัดคลอโรฟิลล์ออกและต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวสูง ไขมันที่ได้มีจำนวนคาร์บอน 12-22 อะตอมต่อโมเลกุล สาหร่ายหลายสายพันธุ์สามารถผลิต high-value unusual fatty acids ใน *Porphyridium* sp. จะมีการสังเคราะห์ arachidonic acid (C20:4) linoleic acid (C18:2) linolenic acid (C18:3) และ eicosapentaenoic acid (C20:5) สามารถนำไขมันที่ได้ไปใช้เป็น hyperlipidemia เพื่อลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือดและใช้เพื่อการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ (health foods) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนานำไปใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง (diesel-fuel substitute) แต่พบว่ายังไม่เหมาะสมเพราะ by product ต่าง ๆ ที่ปนอยู่ในน้ำมันจะเป็นปัญหาต่อเครื่องยนต์ (Becker. 1994)

2.2.2 **แบคทีเรีย** (bacteria)

แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถเลี้ยงได้ในถังหมัก (fermentor) แต่จะให้ปริมาณเซลล์และไขมันต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ องค์ประกอบของกรดไขมันซับซ้อนซึ่งยุ่งยากต่อการสกัด และมีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดโรค หรือมีสารพิษปนกับไขมันที่ได้ จึงไม่นิยมผลิต (Hammond and Glatz.1988) การผลิต docosahexaenoic acid (DHA) จากแบคทีเรียนับ

ว่าน่าสนใจอย่างยิ่ง เพราะสามารถนำเทคโนโลยีชีวภาพที่ทันสมัยมาช่วยในการผลิตได้

Yano *et al.* (1994) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาทะเลน้ำลึกที่สามารถผลิต DHA ได้ถึง 5 สายพันธุ์ โดยจะให้การผลิต DHA ร้อยละ 6.4-11.6 ของกรดไขมันทั้งหมด หรือประมาณ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร Yazawa *et al.* (1988) คัดเลือกได้แบคทีเรียแกรมลบซึ่งให้รหัสว่า SCRC-8132 สามารถผลิตEPA ได้เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส และถ้าเลี้ยงที่ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้ EPA เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 40 ของไขมันทั้งหมด

Akimoto *et al.* (1990) พบว่าที่ 8 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสายพันธุ์ SCRS-2738 ให้การผลิต EPA ได้ในปริมาณ 16.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิเป็น 25 องศาเซลเซียส จะได้ EPA เพียง 7.3 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

### 2.1.3 **ราและยีสต์** (moulds and yeasts)

ราและยีสต์จัดเป็นแหล่งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูง ไขมันที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็น $C_{16}$ และ $C_{18}$ ซึ่งเหมือนกับไขมันจากพืชแต่ต่างจากพืชที่การจัดเรียงตัวของกรดไขมันในองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ การเลี้ยงไม่ต้องใช้พื้นที่มาก ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้น ไขมันที่ได้ไม่มีปัญหาสารพิษปนเปื้อน และสามารถสกัดไขมันออกจากเซลล์ได้ง่ายกว่าในแบคทีเรีย (Laning.1991)

Shimizu *et al.* (1988) พบว่ารา *Mortierella alpina* 20-17 เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิต EPA ได้ดี โดยที่ 12 องศาเซลเซียส ปริมาณ EPA ที่ได้เท่ากับ 29 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง Shirasaka and Shimizu (1995) ได้ศึกษาเชื้อรา *Saprolegnia* sp. 28YTE-1 ที่แยกจากน้ำ พบว่ารานี้สามารถผลิตกรด eicosapentaenoic acid (EPA) และกรด arachidonic acid (AA) ได้ โดยสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ใช้ได้ทั้งแป้ง เด็กซ์ทริน น้ำตาลทราย น้ำตาลกลูโคส และน้ำมันมะกอก โดยน้ำมันมะกอกนั้นจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสามารถใช้ผลิต EPA ได้ 17 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์แห้ง โดยอุณหภูมิเหมาะสมอยู่ที่ 20 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจุลินทรีย์ไขมันสูงดังแสดงในตารางที่ 2.2 ปริมาณของไขมันที่ได้จากยีสต์ไขมันสูงและยีสต์ที่ไม่ใช่ยีสต์ ไขมันสูงดังแสดงในตารางที่ 2.3 และ 2.4 ตามลำดับ

**ตารางที่** 2.2 ชนิดของจุลินทรีย์ไขมันสูงซึ่งสามารถผลิตไขมันได้ร้อยละ 40-80 โดยน้ำหนักแห้ง

| แบคทีเรีย | ยีสต์ | รา | สาหร่าย |
|---|---|---|---|
| *Antrobactor* sp. | *Cryptococcus cervatus* | *Entomophthora conica* | *Botryococcus branuii* |
| | *C. tericolus* | *Cunninghamella elegans* | *Dunaliella salina* |
| | *Candida NCYC 911* | *Mortierella isabelina* | *Nanochoris* sp. |
| | *Lipomyces lipofer* | *M. pusilla* | *Monalanthus salina* |
| | *L. starkeyi* | *M.vinasea* | *Chlorella pylinoidosa* |
| | *L. tetrasporus* | *Mucor circinelloides* | |
| | *Rhodosporidium toruloides* | *M. plumbeus* | |
| | *Rhodotorula glutinis* | *M. mucedo* | |
| | *Tricosporon cutaneum* | *Pythium ultimum* | |
| | *Endomycopsis vernalis* | *Aspergilus fischeri* | |
| | *Trigonopsis variabilis* | *A. oryzae* | |
| | | *Chaetomium globosum* | |
| | | *Furasium bulbigenum* | |
| | | *Oidium lactis* | |
| | | *Gibberella fugikoloi* | |
| | | *Humicola lanuginosa* | |
| | | *Penicilium lilacinum* | |
| | | *P. spinulosum* | |
| | | *Cladosporium herbarum* | |
| | | *Claviceps purpurea* | |
| | | *Austiliago zeae* | |

ที่มา : Leman (1997)

**ตารางที่** 2.3 ยีสต์ไขมันสูง

| สายพันธุ์ยีสต์ | ปริมาณไขมันสูงสุด (ร้อยละ) |
|---|---|
| *Candida* sp. *107* | 45 |
| *Candida curvata D* | 58 |
| *Candida curvata R* | 51 |
| *Candida didensiae* | 37 |
| *Cryptococcus (tericolus) albidus* var. albidus | 65 |
| *Cryptococcus albidus* var. aerius | 63 |
| *Cryptococcus laurentii* | 32 |
| *Endomycopsis vernalis*[a] | 65 |
| *Hansenula ciferri*[b] | 22 |
| *Hansenula sarturnus* | 28 |
| *Lipomyces lipofer* | 64 |
| *Lipomyces starkeyi* | 63 |
| *Lipomyces tetrasporus* | 67 |
| *Rhodosporidium toruloides* | 51 |
| *Rhodosporidium glutinis (glacilis)* | 72 |
| *Rhodotorula graminis* | 41 |
| *Rhodotorula mucilaginosa*[b] | 28 |
| *Trichosporon ceutanium* | 45 |
| *Trichosporon pullulans*[a] | 33 |
| *Trigonopsis variablis* | 40 |
| *Yarrowia (Candida. Saccharomycopsis) lipolytica (palalipolytica)* [b] | 36 |

หมายเหตุ [a] คาดว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน

[b] ยังไม่ชัดเจนว่าเป็นยีสต์ไขมันสูงหรือไม่

ที่มา : Ratledge and Tan (1990)

**ตารางที่** 2.4 ปริมาณไขมันในยีสต์ที่ไม่ใช่ยีสต์ไขมันสูง

| สายพันธุ์ยีสต์ | สภาวะการเจริญ | ปริมาณไขมัน (ร้อยละ) |
|---|---|---|
| *Candida utilis* | ที่ปริมาณกลูโคสต่ำ | 6.7 |
| *Candida utilis* | ที่ปริมาณกลูโคสสูง | 18.2 |
| *Hansenula anomola* | - | 9 |
| *Lipomyces kononenkoae CBS 2514* | - | 5.6 |
| *Lipomyces kononenkoae CBS 5608* | - | 4.7 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | Aerobic | 8.8 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | Anaerobic | 6.1 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | ที่ปริมาณกลูโคสต่ำ | 5.2 |
| Saccharomyces cerevisiae | ที่ปริมาณกลูโคสสูง | 3.6 |
| *Schwanniomyces occidentalis* | ที่ปริมาณกลูโคสต่ำ | 4.4 |
| *Schwanniomyces occidentalis* | ที่ปริมาณกลูโคสสูง | 9.4 |

ที่มา : Ratledge and Evans (1989)

## 2.2 การคัดเลือกยีสต์

ในธรรมชาติซึ่งได้แก่ ในดิน น้ำ ในพืช และในสัตว์ จะมียีสต์อยู่รวมกันอยู่มากกว่า 100 สปีชีส์ วิธีการพื้นฐานที่จะคัดแยกยีสต์ที่ต้องการออกมาจากธรรมชาติคือการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ หรือใช้สภาวะที่ปรับให้เหมาะสมซึ่งจะทำให้ยีสต์ที่เราต้องการเจริญเติบโตแล้วแสดงลักษณะเด่นเฉพาะตัวออกมา ดินเป็นแหล่งธรรมชาติที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของยีสต์ เนื่องจากอุดมด้วยแร่ธาตุซึ่งเกิดจากการสะสมของซากพืชซากสัตว์ การเจริญของยีสต์ในระบบนิเวศน์ธรรมชาติมักขึ้นกับสภาวะต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช เปอร์เซ็นต์เกลือ ปริมาณน้ำตาล และองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นต่าง ๆ ยีสต์ที่เจริญได้ในอาหารทั่ว ๆ ไป ไม่จำกัดหรือเฉพาะเจาะจงสารอาหารใดเป็นพิเศษ จะเรียกว่า "polytropic" แต่ยีสต์บางสปีชีส์ที่มีความเฉพาะตัวในการเจริญซึ่งเป็นลักษณะพิเศษ เช่น เจริญได้ในอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลหรือเกลือสูง ๆ จะเรียกยีสต์นั้นว่า "oligotropic" ดังนั้นเมื่อทราบถึงคุณลักษณะเฉพาะของยีสต์ที่ต้องการคัดเลือกก็จะทราบได้ว่า

ระบบนิเวศน์ใดควรมียีสต์ที่เราต้องการอาศัยอยู่ก็จะสามารถเก็บตัวอย่างจากระบบนิเวศน์นั้นมาคัดเลือกยีสต์ที่ต้องการได้

การใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับอาหารตามธรรมชาติมาก ๆ และใช้วิธีการที่เหมาะสมก็สามารถใช้แยกยีสต์ที่ต้องการจากธรรมชาติได้

2.2.1 **การใช้** elective media

เป็นการใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่ต้องการคัดเลือก แต่ก็ไม่มีการเติมสารอื่นที่จะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ โดยตรง

2.2.1.1 **การใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ทั่วไป** (general yeast enrichments)

เช่น มีการใช้ D2O (dextrose 20%) ซึ่งประกอบด้วย yeast nitrogen base malt extract yeast extract และกลูโคส หรือมีการทดลองปรับปรุงการใช้ D2O โดยมีการเติม Tween 80 (0.01%) ได้เป็นสูตร D2OT ซึ่งช่วยเพิ่มคุณสมบัติการเปียกน้ำซึ่งจะเป็นข้อได้เปรียบเมื่อต้องการคัดเลือกยีสต์จากแหล่งที่มีราปนเปื้อนมาด้วย หรืออาจมีการเติมอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อเป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงพีเอช เพื่อที่จะสามารถปรับให้ได้พีเอชที่เหมาะสม ยีสต์ที่ได้จากแหล่งที่เจือจางหรือมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ มากก็อาจแยกโดยนำตัวอย่างจำนวนเล็กน้อย (น้อยกว่า 0.1 กรัม) ใส่ใน 15 มิลลิลิตรของ D2OT ทิ้งให้มีการเจริญของยีสต์จากนั้นนำมา 1 ลูป สตรีคบนจานอาหาร YM agar ที่ปรับให้พีเอชเป็นกรดในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์แล้ว มีการใช้ D2OT โดยใช้ D-xylose แทน D-glucose เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่สามารถหมักน้ำตาล D-xylose

2.2.1.2 **การใช้** specific enrichments

เป็นการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่มีการเสริมอาหารที่มีความจำเพาะเจาะจงแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจน เช่น มีการใช้เมทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ cycloserin และpenicillin เป็นสารต้านแบคทีเรียในการคัดเลือกยีสต์ที่สามารถย่อยสลายเมทธานอลได้เป็นต้น หรืออาจเป็นการเติมวิตามินหรือเกลือแร่ที่จำเพาะต่อยีสต์เป้าหมายก็ได้

2.2.2 **การใช้** selective media

2.2.2.1 **การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารต้านจุลินทรีย์อื่น** (selection against other microorganisms)

อาหารแข็งที่ใช้ในการแยกยีสต์จากธรรมชาติต้องเป็นอาหารที่มีการเติมสารป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย เช่น มีการใช้สารปฏิชีวนะ ในการแยกยีสต์ที่มีแบคทีเรียปนมาก แต่

จะมีข้อเสียคืออาจเป็นอันตรายในระหว่างปฏิบัติการ การใช้ acidified agar ก็เพียงพอแล้วสำหรับการแยกยีสต์ที่มีแบคทีเรียปน ซึ่งควรปรับให้ได้พีเอชประมาณ 3.7 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้

2.2.2.2 **การใช้** selection of specific yeasts

เป็นการใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารอาหารที่ส่งเสริมการเจริญของยีสต์ที่เราต้องการเท่านั้น เช่นใช้ yeast nitrogen base โดยใช้ inositol เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อคัดเลือก *Cryptococcus cereanus* หรือใช้เมทธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อคัดเลือก *Candida sonorensis* เป็นต้น

นอกจากนี้การใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะแล้ว การใช้วิธีปรับสภาพของอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนให้เหมาะสมกับยีสต์ที่ต้องการคัดเลือกก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ เช่น ในการทดลองต้องการแยกเชื้อยีสต์ไขมันสูงที่ย่อยแป้งได้ก็จะปรับให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียวจะไม่มีการใช้น้ำตาล ในขณะเดียวกันก็ปรับให้สภาวะการเจริญเหมาะสมสำหรับยีสต์เป้าหมายซึ่งจะยับยั้งการเจริญแข่งกับจุลินทรีย์อื่น ซึ่งทำได้โดยปรับให้พีเอชเหมาะสมเท่ากับ 3.5 และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมิต่ำและความเป็นกรดสูงนี้แบคทีเรียก็จะไม่สามารถเจริญแข่งได้

## 2.3 ลักษณะของไขมันจากยีสต์ไขมันสูง

ยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันได้มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้งขึ้นไป จัดเป็นยีสต์ไขมันสูง ชนิดและปริมาณของไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ สารอาหาร และสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยง เช่น พีเอช อุณหภูมิ เป็นต้น ซึ่งไขมันที่พบในยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 2.5 (Hammond and Glatz. 1988 ; Walker.1998)

**ตารางที่** 2.5 องค์ประกอบของไขมันในยีสต์ไขมันสูงบางสายพันธุ์

| สายพันธุ์ | ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | TG | DG | MG | FFA | S | SE | PL | G |
| *Cryptococcus albidus (terricolus)* | 92 | 2.5 | 1 | 3 | 1 | 1 | 2 | - |
| *Lipomyces stakeyi* | 95 | 1 | - | <1 | 1 | - | 3 | - |
| *Rhodotorula glutinis* | 67 | - | - | 4 | 2 | 7 | 11 | 6 |
| *Tricosporon pullulans (Endocopsis vernalis)* | 82 | 1 | - | - | 10 | 1 | 4 | - |

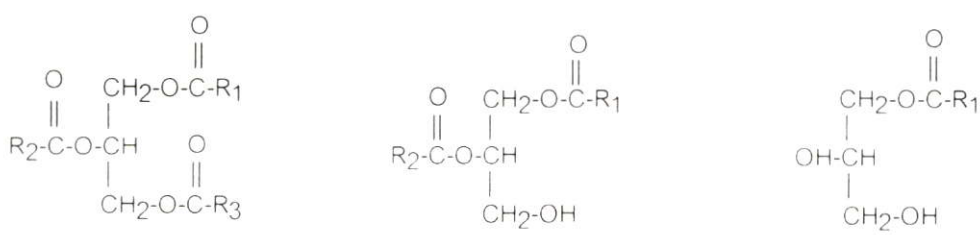
หมายเหตุ : TG:ไตรกลีเซอไรด์; DG:ไดกลีเซอไรด์ ; MG:โมโนกลีเซอไรด์ ; FFA:กรดไขมันอิสระ S: สเตอรอล ; SE:สเตอรอลเอสเทอร์ ; PL:ฟอสโฟลิปิด ; G:ไกลโคลิปิด

ที่มา : Ratledge and Tans (1990)

ชนิดของไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูงได้แก่

2.3.1 **กลีเซอไรด์** (glyceride)

กลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลอาจถูกแทนที่ด้วยกรดไขมันตั้งแต่ 1 2 และ 3 ตำแหน่ง ซึ่งจะเรียกว่า โมโน ได หรือ ไตรกลีเซอไรด์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ไตรกลีเซอไรด์เป็นผลผลิตหลักซึ่งอยู่ในรูปหยดไขมันเล็ก ๆ ภายในเซลล์ต้องทำให้เซลล์แตกก่อนจึงสกัดออกมาได้ ไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จะมีกรดโอเลอิค (C18:1) ร้อยละ 40-50 กรดปาลมิติค (C16:1) ร้อยละ 20-30 กรดสเตียริค (C18:0) ร้อยละ 15 และกรดโอเลอิค (C18:2) ร้อยละ 5 (Ratledge. 1992 ; Walker. 1998 : Misra *et al.* 1984)




ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์

**รูปที่** 2.1 สูตรโครงสร้างของกลีเซอไรด์

ที่มา : Ratledge and Tan (1990)

กลีเซอไรด์เป็นไขมันที่พบมากที่สุดในเซลล์คือ มีถึงร้อยละ 80 ของไขมันทั้งหมด กลีเซอไรด์ที่พบมากที่สุดในยีสต์ คือ ไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งกรดไขมันในไตรกลีเซอไรด์ในยีสต์ที่พบนั้นมี

จำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-24 อะตอม โดยชนิดที่มีคาร์บอน 16-18 อะตอม จะพบมากที่สุดซึ่งมีทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว องค์ประกอบของไขมันในยีสต์ไขมันสูงดังแสดงในตารางที่ 2.6

**ตารางที่** 2.6 กรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูง

| สายพันธุ์ | ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 18:4 | 20:0 | 22:0 | 23:0 | 24:0 |
| *Candida 107* | 44 | 5 | 8 | 31 | 9 | 1 | | | | | |
| *Candida cervata* | 25 | | 10 | 57 | 7 | | | | | | |
| *Candida diddensiae* | 19 | 3 | 5 | 45 | 17 | 5 | 1 | | | | |
| *Cryptococcus albidus* | 16 | 1 | 3 | 56 | | 3 | | 7 | 12 | | |
| *Endomycopsis vernalis* | 15 | | 2 | 57 | 24 | 1 | | | | | |
| *Hansenula satomus* | 16 | 16 | | 45 | 16 | 5 | | | | | |
| *Lipomyces lipofer* | 37 | 4 | 7 | 48 | 3 | | | | | | |
| *Lipomyces stakeyi* | 34 | 6 | 5 | 51 | 3 | | | | | | |
| *Lipomyces tetrasporus* | 31 | 4 | 15 | 43 | 6 | 1 | | | | | |
| *Rhodosporium toruliodes* | 18 | 3 | 3 | 66 | | | | | | 3 | 6 |
| *Rhodotorula glacilis* | 14 | 2 | 4 | 26 | 49 | 3 | | | | | |
| *Rhodotorula glutinis* | 10 | 9 | | 19 | 44 | 16 | | | | | |
| *Tricosporon cutanium* | 13 | | 22 | 50 | | | | | | | |

ที่มา : Ratledge and Tan (1990)

เมื่อเปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับกรดไขมันจากพืชพบว่าจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันดังแสดงในตารางที่ 2.7

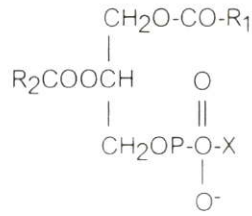
**ตารางที่** 2.7 เปรียบเทียบกรดไขมันจากยีสต์ไขมันสูงกับไขมันจากพืชน้ำมัน

| แหล่งไขมัน | ปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ (ร้อยละ) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:0 |
| *Candida* 107 | 2 | 3 | 37 | 1 | 11 | 35 | 8 | 0 | 3 |
| Palm oil | 2 | 3 | 39 | 2 | 6 | 38 | 10 | 0 | 0 |
| *Rhodotorula gracilis* | 0 | 1 | 18 | 1 | 6 | 41 | 24 | 1 | 9 |
| Soybean oil | 0 | 0.1 | 10.5 | 0 | 3.2 | 22.3 | 54.5 | 8.3 | 0.2 |
| Safflower oil | 0 | 0.1 | 6.7 | 0 | 2 | 12.9 | 77.5 | 0 | 0.5 |
| Corn oil | 0 | 0 | 11.5 | 0 | 2.2 | 26.6 | 58.7 | 0.8 | 0.2 |
| Olive oil | 0 | 0 | 16.9 | 1.8 | 2.7 | 61.9 | 14.8 | 0.6 | 0.4 |
| Rapseed oil | 0 | 0.1 | 4 | 0.1 | 1.3 | 17.4 | 12.7 | 5.3 | 0.9 |
| Kopok oil | 0 | 0 | 19.5 | 3.5 | 3.9 | 38 | 30.9 | 1 | 0 |
| Groundnut oil | 3 | 5 | 20 | 2 | 7 | 43 | 18 | 0 | 0 |

ที่มา : Ratledge (1981)

### 2.3.2 **ฟอสโฟลิปิด** (phospholipid)

ฟอสโฟลิปิดเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล และมีหมู่กรดฟอสฟาติค ฟอสโฟลิปิดที่พบในธรรมชาติเป็น L-form เป็นส่วนสำคัญของเซลล์เมมเบรน สูตรทั่วไปของฟอสโฟลิปิดแสดงดังรูปที่ 2.2 ฟอสโฟลิปิดที่พบในยีสต์เป็นฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidyl choline) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งพบว่ามีประมาณร้อยละ 35-50 ของฟอสโฟลิปิดทั้งหมด และมีฟอสฟาติดิลเอทาโนลามิน (phosphatidyl ethanolamine) ประมาณร้อยละ 25-32 ของฟอสโฟลิปิดทั้งหมด และส่วนน้อยจะเป็นพวกฟอสฟาติดิลอินโนซิทอล (phosphatidyl inositol) และฟอสฟาติดิลซีริน (phosphatidyl serine)



X : glycerophospholipid โดย X อาจเป็นเช่น

-H : phosphatidic acisd (PA)

$-CH_2CH_2NH_3$ : phosphatidylethanolamine (PE)

$-CH_2CH_2N\ H_2CH_3$ : phosphatidylmonomethylethanolamine (PMME)

$-CH_2CH_2N\ H(CH_3)_2$ : phosphatidyldimethylethanolamine (PDME)

$-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ : phosphatidylcholine (lecithin) (PC)

$-CH_2CH(COOH)NH_3$ : phosphatidylserine (PS)

$-CH_2CH(OH)CH_2\ OH$ : phosphatidylglycerol (PG)

**รูปที่** 2.2 สูตรทั่วไปของฟอสโฟลิปิดชนิดต่าง ๆ

ที่มา : Ratledge and Tan (1990)

### 2.3.3 **ไฮโดรคาร์บอน** (hydrocarbon)

ในยีสต์พบไฮโดรคาร์บอนในปริมาณไม่มากนัก มีรายงานว่าพบสควอลีน (squaline) ($C_{30}$) ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และใน *Saccharomyces carlsbergensis* สควอลีนนั้นเป็นสารตั้งต้นของสเตียรอยด์

### 2.3.4 **สฟิงโกลิปิด** (sphingolipid)

สฟิงโกลิปิดเป็นไขมันที่มีสายยาว (long chain base) ซึ่งมีกรดไขมันต่อกับหมู่อะมิโนด้วยพันธะเอไมด์ ซึ่งรวมเรียกว่า เซราไมด์ (ceramide) และมีหมู่เพิ่มเข้ามาคือ หมู่ฟอสเฟต ($PO_4^{3-}$) และไนโตรเจนเบส (nitrogen base) เช่น โคลีน (choline) สฟิงโกลิปิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์เมมเบรน สฟิงโกลิปิดแบ่งออกเป็น 3 ชนิดด้วยกันคือ สฟิงโกไมอีลินเซเรโบรไซด์ (sphingomyelin cerebrosides) และ แกงกลิโอไซด์ (gangliosides) ในยีสต์พบเฉพาะเซเรโบรไซด์ สฟิงโกลิปิดที่พบในยีสต์ส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์ของไฟโตสฟิงโกซีน (phytosphingosines) และไดไฮโดรสฟิงโกซีน (dihydrosphingosine) อย่างไรก็ตามการพบ

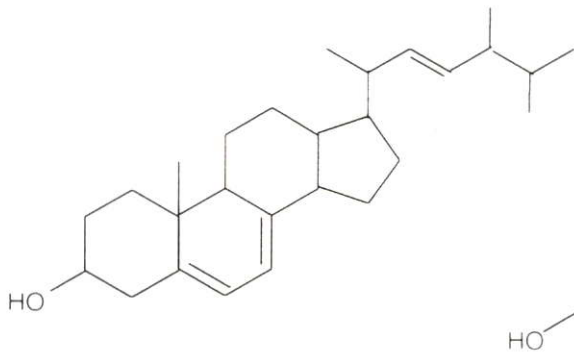
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



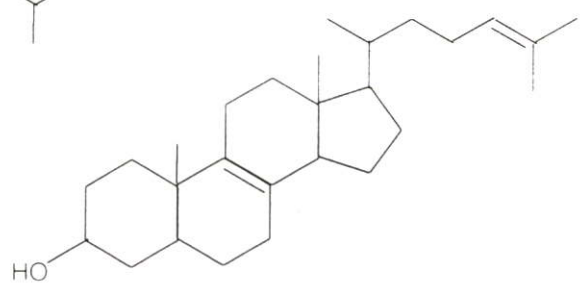
สฟิงโกซีนในยีสต์ซึ่งมักจะอยู่รวมกับสารประกอบอื่นในรูปไกลโค (glyco) และอินโนสิทอลฟอส ฟอริลสฟิงโกลิปิด (inositol phosphoryl sphingolipids)

### 2.3.5 สเตียรอยด์ (steroid compound)

สเตียรอยด์เป็นอนุพันธ์ของไซโคลเพนตาโนไฮโดรฟีแนนทรีน(cyclopentanohydrophenan threne) ตัวอย่างสเตียรอยด์ดังแสดงรูปสูตรโครงสร้างในรูปที่ 2.3 สเตียรอยด์ในยีสต์พบทั้งในรูปอิสระและในรูปเอสเทอร์ประมาณร้อยละ 0.1-1.0 ของไขมันทั้งหมดในยีสต์ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นเออโกสเตอรอล (ergosterol) และไซโมสเตอรอล (zymosterol)




เออโกสเตอรอล (ergosterol)




ไซโมสเตอรอล (zymosterol)

**รูปที่** 2.3 สูตรโครงสร้างทั่ว ๆ ไปของสเตียรอยด์
ที่มา : Ratledge and Tan (1990)

## 2.4 การผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูง

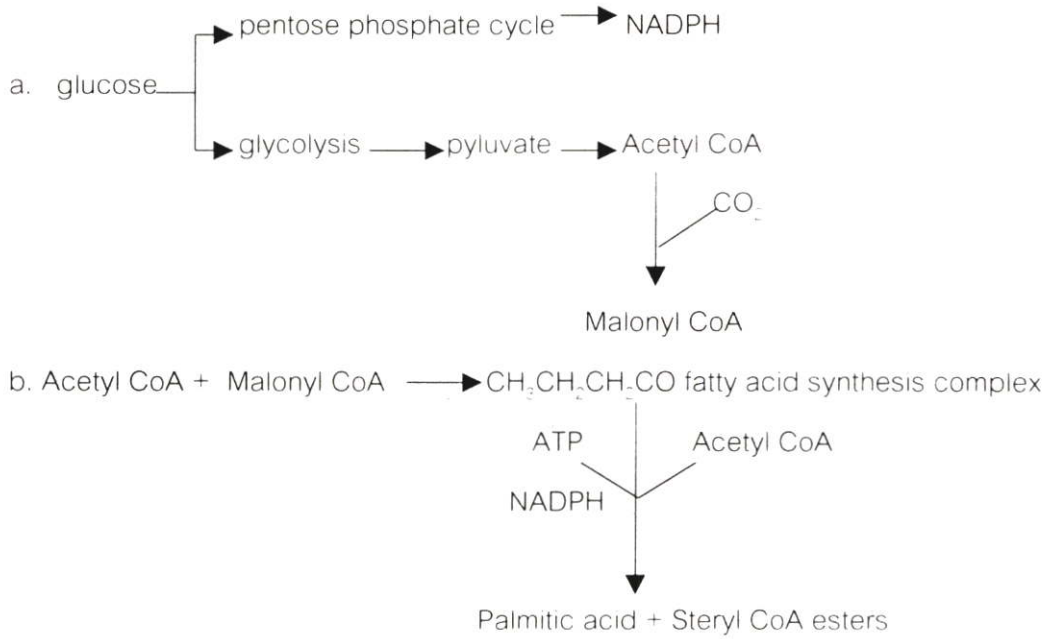
### 2.4.1 การสังเคราะห์ไขมัน

Botham and Ratledge (1979) ศึกษาพบว่าการผลิตไขมันของยีสต์ไขมันสูง *Candida* sp. 107 เริ่มจากการที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกจำกัดปริมาณไนโตรเจนจึงทำให้ภายในเซลล์มีความเข้มข้นของ AMP ต่ำทำให้เอนไซม์ NAD$^+$ dependent isocitrate dehydrogenase ซึ่งจะเมแทบอลิซึมซิเตรทผ่าน tricarboxylic acid cycle ในไมโตคอนเดรียถูกยับยั้ง จากนั้นเอนไซม์ ATP : citrate lyase จะเปลี่ยนซิเตรท (citrate) ไปเป็นอะซิติลโค-เอ (acetyl-CoA) จากนั้นอะซิติลโค-เอจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันโดยเอนไซม์อะซิติลโค-เอ คาร์บอกซิเลส (acetyl-CoA carboxylase) ซึ่งต้องใช้พลังงานจาก ATP สูงและออกซาโลอะซิเตรท (oxaloacetrate) จะถูกเปลี่ยนเป็นมาเลท (malate) และเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) ต่อไป ส่วน Botlton and

Ratledge (1981) พบว่าเอนไซม์อะซิติลโค-เอ คาร์บอกซิเลสมีบทบาทในการควบคุมอัตราการผลิตไขมันของยีสต์ไขมันสูง อัตราการผลิตไขมันจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อะซิติลโค-เอ คาร์บอกซิเลส โดยจะพบเอนไซม์นี้เฉพาะในองค์ประกอบของเซลล์ของจุลินทรีย์ไขมันสูงเท่านั้น เมื่อไนโตรเจนมีปริมาณลดลงซึ่งเป็นช่วงการผลิตไขมันเอนไซม์นี้จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น (Evans and Ratledge. 1983 ; Walker.1998)

Pan and Rhee (1985) ศึกษาปริมาณเซลล์ (biomass yield) และค่าสารให้พลังงาน (energetic yield) ของยีสต์ *Rhodotorula glutinis* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทำการหมักแบบแบช เปรียบเทียบกับยีสต์ที่ไม่ใช่ยีสต์ไขมันสูง พบว่าในยีสต์ไขมันสูงจะให้ปริมาณเซลล์ต่ำกว่าแต่จะให้ผลผลิตที่เป็นค่าพลังงานที่สูงมากกว่า

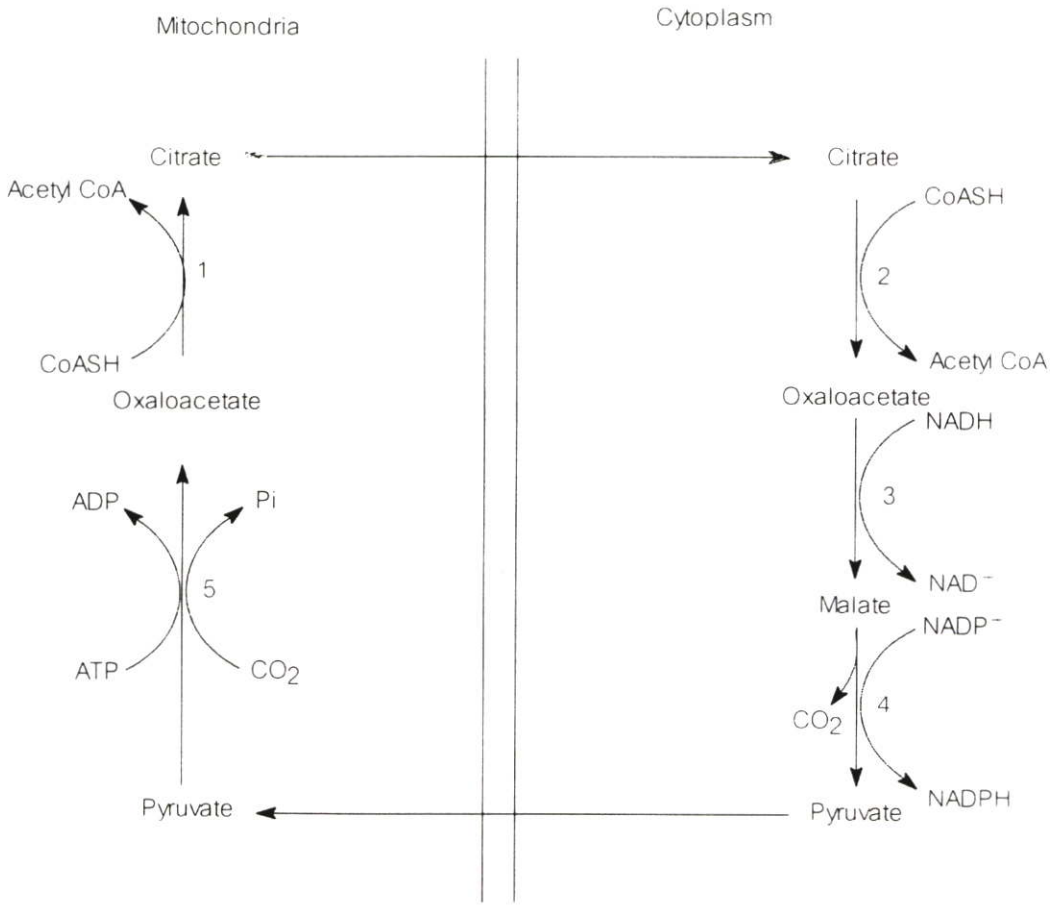
ในขบวนการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นไขมันนั้น ประกอบด้วยหลายขั้นตอนขบวนการสร้างไตรกลีเซอไรด์ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.4




**รูปที่** 2.4 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์จากคาร์โบไฮเดรต
ที่มา : Ratledge and Evans (1989)

ในขบวนการสังเคราะห์กรดปาลมิติคจากอะซิติลโค-เอ ซึ่งใช้พลังงานจาก ATP และ NADPH จาก pentose phosphate pathway ขบวนการนี้เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมตั้งแต่อะซิติล

โค-เอ ซึ่งอยู่ในไมโตคอนเดรีย ที่จะใช้สังเคราะห์นั้นมาจากวิธีไกลโคไลซิส ดังนั้นจึงต้องมีการนำเอาอะซิติลโค-เอ จากไมโตคอนเดรียเข้าสู่ไซโตพลาสซึม ดังรูปที่ 2.5



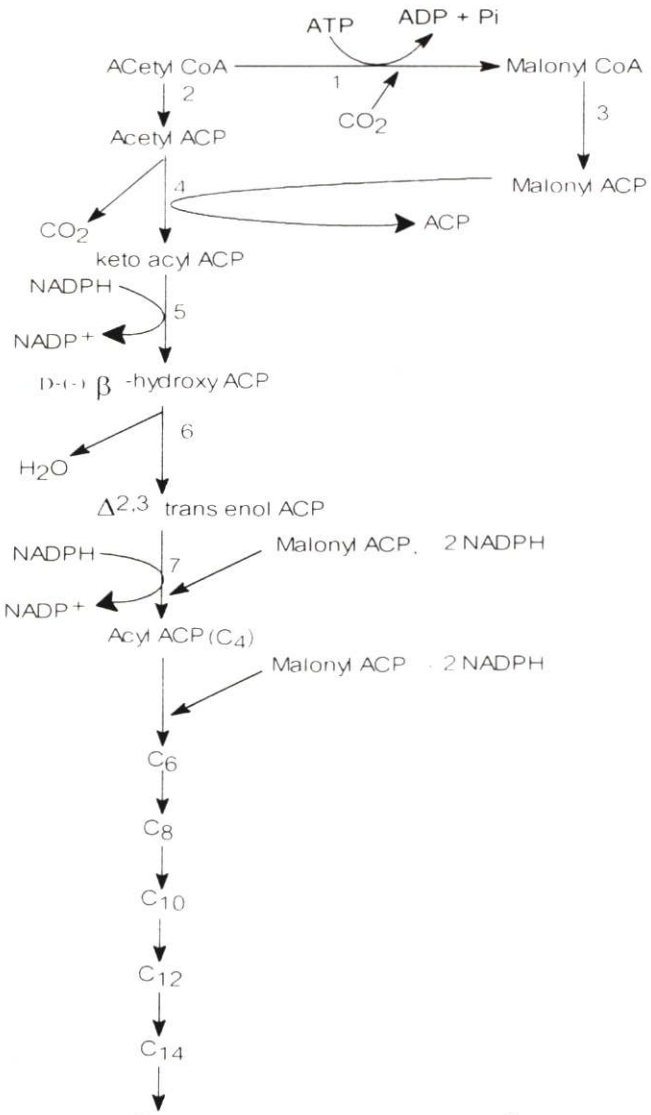

**รูปที่** 2.5 การนำเอาอะซิติลโค-เอจากไมโตคอนเดรียออกสู่ไซโตพลาสซึมเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน

ที่มา : Ratledge and Evans (1989)

จากนั้นเข้าสู่ขบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในไซโตพลาสซึมซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ fatty acid synthetase complex เริ่มจาก acetyl CoA + $CO_2$ $\longrightarrow$ malonyl CoA โดยใช้พลังงานจาก ATP จากนั้นอะซิติลโค-เอ และมาโลนิลโค-เอ จะทำปฏิกิริยากับ Acyl carrier protein (ACP) กลายเป็น Acetyl-ACP และ Malonyl-ACP ซึ่งจะรวมกันได้ Acyl ACP ($C_4$) ซึ่งจะ

ต้องใช้ 2 NADPH จากนั้นปฏิกิริยาก็จะซ้ำเดิมทั้งหมด (4 ขั้นตอน) คือ เติมคาร์บอนทีละ 2 อะตอมไปเรื่อย ๆ จนถึงกรดปาลมิติค ดังรูปที่ 2.6

การสังเคราะห์กรดไขมันต้องใช้ ATP และ NADPH เป็นจำนวนมาก ซึ่ง ATP นี้ได้มาจาก catabolism ส่วน NADPH ได้มาจาก malic enzyme และ pentose phosphate pathway




1 : Acetyl CoA carboxylase 5 : reductase (β - ketoacyl ACP reductase)

2 : Acetyl transferase (Acetyl transacylase) 6 : hydratase (β- hydroxyacyl-dehydrase)

3 : Malonyl transferasse (Malonyl transacylase)

4 : Synthetase (β- ketoacyl ACP synthetase) 7 : reductase (enol – ACP reductase)

**รูปที่** 2.6 การสังเคราะห์กรดไขมันในไซโตพลาสซึม

ที่มา : Ratledge and Evans (1989)

การสังเคราะห์กรดไขมันที่มีคาร์บอนมากกว่า 16 อะตอม อาศัย microsomal chain elongation system ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบใน endoplasmic reticulum (หรือ microsome) กรดไขมันที่ทำปฏิกิริยาจะอยู่ในรูปของ fatty acyl CoA การเพิ่มความยาวของคาร์บอนเพิ่มทีละ 2 อะตอม โดยอาศัยมาโลนิลโค-เอและ NADPH ควบคุมเอนไซม์ที่มีกลไกการทำงานคล้าย fatty acid sythetase complex แต่อยู่อย่างอิสระใน endoplasmic reticulum หรือ microsome

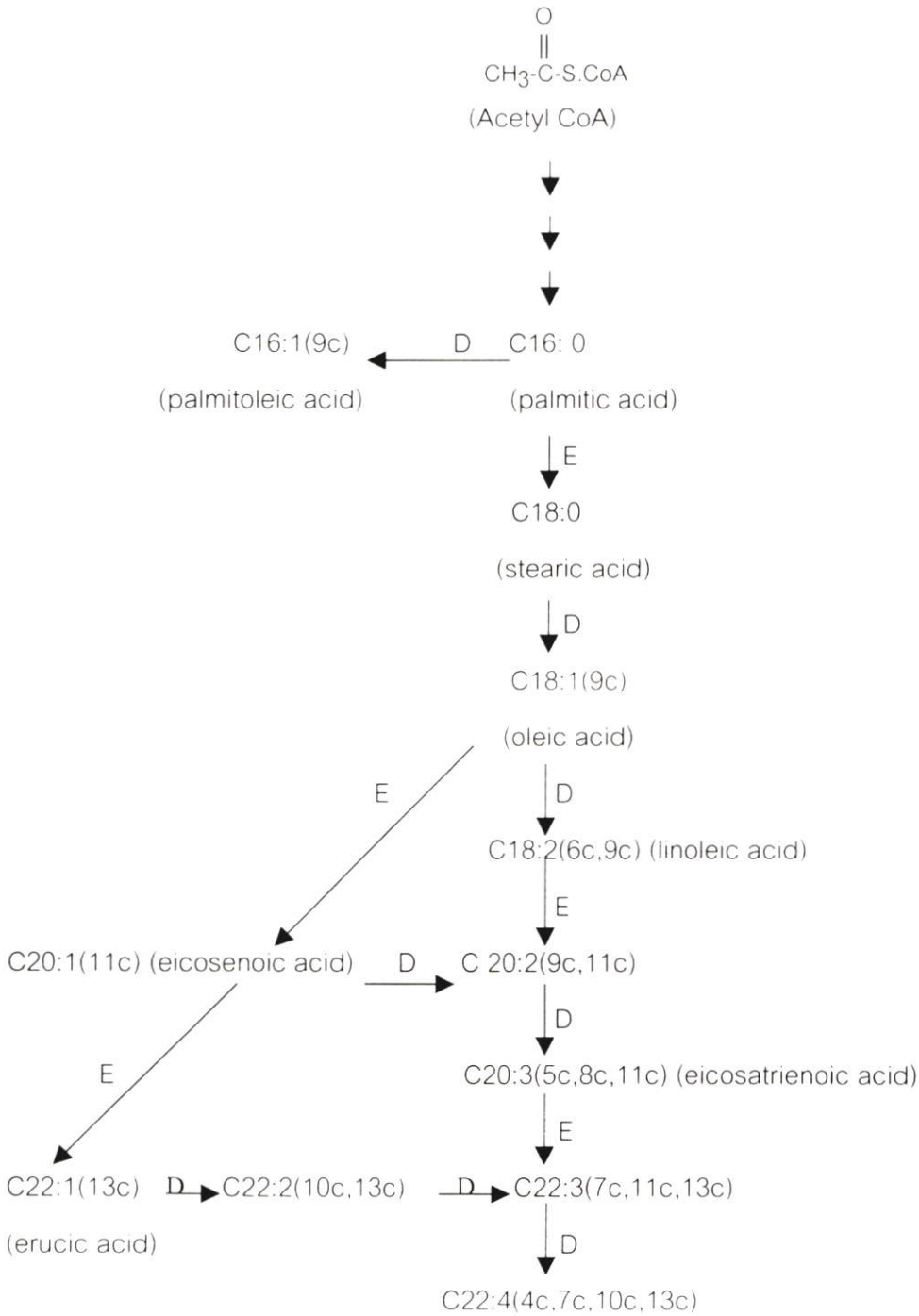
นอกจากนี้ chain elongation อาจเกิดในไมโตคอนเดรียโดย fatty acyl CoA จะรวมกับ acyl CoA การสร้างพันธะคู่ให้แก่กรดไขมันโดยใช้ออกซิเจนและ reduce nicotinamide coenzyme และ electron transport system เรียกระบบนี้ว่า microsomal desaturase system เช่น

ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นใน microsomal ยีสต์มีแนวโน้มที่จะสร้างเพียง mono และ di unsatturated fatty acid ของ $C_{16}$ และ $C_{18}$ แต่ในราพบว่ามี polyenoic unsatturated fatty acid หลายอย่าง การสังเคราะห์ polyenoic unsatturated fatty acid ดังแสดงในรูปที่ 2.7 2.8 และ 2.9 ขั้นตอนการ สังเคราะห์ polyenoic unsatturated fatty acid ชนิด $\omega_9$ วัตถุดิบที่ใช้คืออะซิติลโค-เอ ปฏิกิริยามี 3 ขั้นตอนที่สำคัญคือ

ขั้นตอนที่ 1 การสร้างกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 16 ขึ้นไป จากอะซิติลโค-เอ

ขั้นตอนที่ 2 การสร้าง cis-9 double bond mono unsaturated fatty acid จากกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 16 ขึ้นไป โดยเอนไซม์ direct desaturases

ขั้นตอนที่ 3 การสร้างพันธะคู่ (double bond) ตั้งแต่ 2 พันธะขึ้นไปซึ่งเกิดในส่วนของโมเลกุลของ mono unsaturated fatty acid ที่อยู่ระหว่าง cis-9 double bond กับปลาย carboxilic group (-COOH) อาจตามด้วย chain elongation สลับกับ desatulation



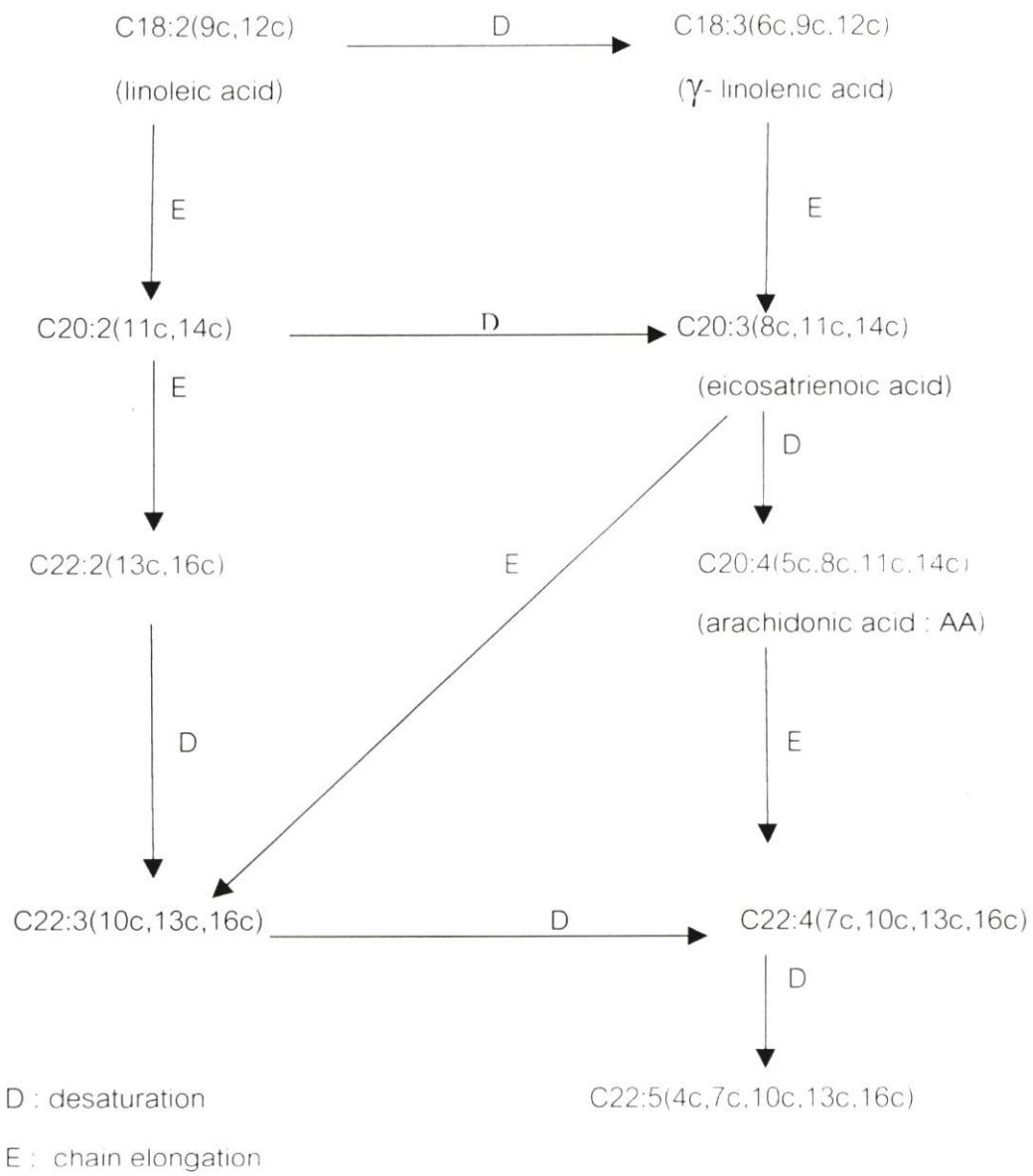

E : chain elongation

D : desaturation

**รูปที่** 2.7 การสังเคราะห์ unsatturated fatty acid ชนิด $\omega_9$

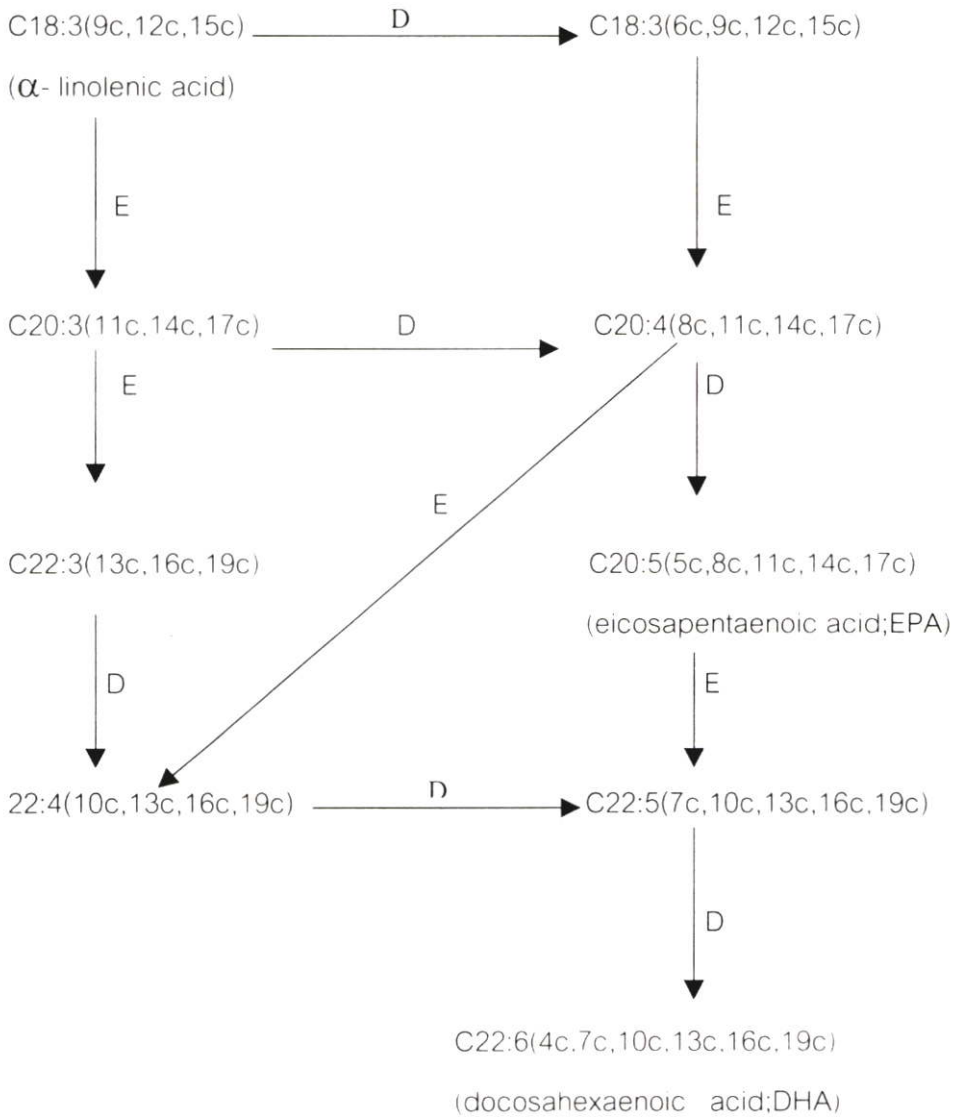
ที่มา : ปาน พิมพา (2522)

การสังเคราะห์ unsatturated fatty acid ชนิดโอเมก้า 6และ 3 วัตถุดิบที่ใช้คือ essential fatty acid จากอาหาร Linoleic acid C18:2(9c,12c) และ Linolenic acid C18:2(9c,12c,15c) ใช้ปฏิกิริยา desaturation สร้าง double bond ใหม่แก่ส่วนที่อยู่ระหว่างตั้งแต่ cis-9 double bond ถึงปลาย carboxilic group (-COOH) แลใช้ปฏิกิริยา chain elongation




**รูปที่** 2.8 การสังเคราะห์ unsatturated fatty acid ชนิด (ต่อ)

ที่มา : ปาน พิมพา (2522)




D : desaturation

E : chain elongation

**รูปที่** 2.9 การสังเคราะห์ unsatturated fatty acid ชนิด $\omega_3$

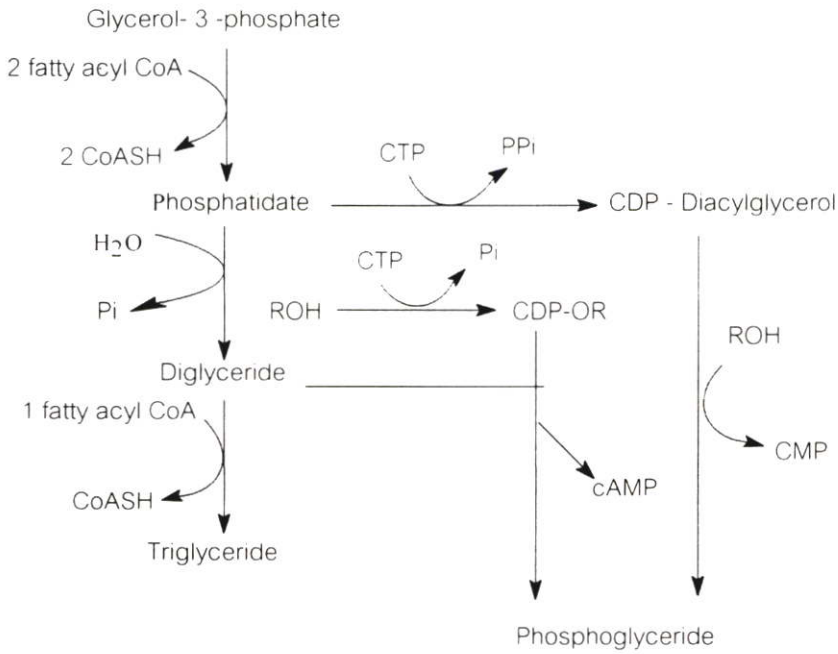
ที่มา : ปาน พิมพา (2522)

การทำให้สายของกรดไขมันมีอะตอมของคาร์บอนลดลงเพื่อที่จะสร้างกรดไมริสติค (myristic acid : $C_{14}$) และกรดลอริค (lauric acid : $C_{12}$) ทำได้โดยขบวนการ β-oxidation

β-oxidation เป็นขบวนการสลายกรดไขมันในไมโตคอนเดรีย ซึ่งจะทำให้ได้กรดไขมันที่มีอะตอมของคาร์บอนลดลง 2 อะตอม และจะได้ NADH $FADH_2$ และ acetyl CoA

กรดไขมันที่สังเคราะห์ได้ จะเก็บไว้ในรูปของไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์ เพราะว่ากรดไขมันละลายน้ำได้ยากจะอยู่ในรูปไมเซลล์ (micelle) รวมทั้งคุณสมบัติของการเป็น

oxidizing agent และเป็นกรดจึงเป็นพิษต่อเซลล์ จึงสร้างพันธะเอสเทอร์กับสารประกอบอื่น ๆ ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลีเซอรอล ซึ่งจะได้กลีเซอไรด์ fatty acyl CoA รวมตัวกับ glycerol-3-phosphate ซึ่งได้จากกลีเซอรอลเกิดเป็น phosphatidate เมื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกไป จะได้กลีเซอไรด์ซึ่งสามารถรวมตัวกับสารอื่น เช่น โคลีน ซีรีน และอิโนซิทอล เป็นต้น กลายเป็นฟอสโฟกลีเซอไรด์ แต่การรวมตัวกันนั้น phosphatidate จะถูกเปลี่ยนเป็น active form ในรูปของอนุพันธ์ cytidine diphosphate (CDP) คือ CDP-diacylglycerol แล้วจึงรวมตัวกับสารอื่น ๆ บางครั้งอนุพันธ์ CDP จะเกิดกับสารที่มารวมตัวด้วย เช่น CDP-choline ซึ่งถือได้ว่าเป็น active form ของโคลีน แล้วจึงรวมตัวกับไดกลีเซอไรด์เป็นฟอสโฟกลีเซอไรด์ ดังรูปที่ 2.10




**รูปที่** 2.10 การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟกลีเซอไรด์

ที่มา : Ratledge and Evans (1989)

2.4.2 **กลไกการควบคุมการเมแทบอลิซึมของไขมัน** (Regulation of lipid metabolism)

กลไกการควบคุมการสร้างไขมันประกอบด้วย

2.4.2.1 **ปริมาณและความสามารถในการเร่งของเอนไซม์** (activity of enzyme)

ในขบวนการผลิตกรดไขมันเอนไซม์ต่อไปนี้อาจช่วยกระตุ้น (activate) ให้มีการสังเคราะห์กรดไขมันมากขึ้น

ก) **เอนไซม์** pentose phosphate pathway

เอนไซม์ใน pentose phosphate pathway คือ glucose-6-phosphate dehydrogenase และ 6-phosphogluconate dehydrogenase จะเร่งให้กลูโคสเข้าสู่ pentose phosphate pathway มากขึ้นเป็นผลให้มี NADPH ซึ่งใช้ในขบวนการสังเคราะห์กรดไขมันผลิตออกมามากขึ้น

ข) Acetyl CoA carboxylase

Acetyl CoA carboxylase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาจาก Acetyl CoA $\longrightarrow$ Malonyl CoA ซึ่ง Malonyl CoA นี้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน

ค) Fatty acid synthetase

Fatty acid synthetase เป็น complex enzyme ที่เร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์กรดไขมันซึ่งเริ่มจาก Acetyl CoA รวมกับ Malonyl CoA จนถึง Acyl CoA ($C_4$)

ในการควบคุมเมแทบอลิซึมของไขมันโดยเอนไซม์นั้นสามารถควบคุมได้ 2 ลักษณะ คือ short-term control จะเกี่ยวข้องกับ allosteric regulation และ covalent enzyme modification ซึ่งจะมีผลกับกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ และอีกลักษณะหนึ่งก็คือ long-term control ที่ควบคุมปริมาณของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ Acetyl CoA decarboxylase ในยีสต์ถูกควบคุมโดย long-term regulation ซึ่งพบว่าถ้ามีปริมาณ long-chain fatty acid ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ปริมาณของเอนไซม์นี้ลดลงเนื่องจากการลดลงของ mRNA ซึ่งเป็นแม่พิมพ์ในการสร้างเอนไซม์

2.4.2.2 Reducing equivalent and activator

Reducing equivalent ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน คือ NADPH ซึ่งได้มาจาก pentose phosphate pathway และ malic enzyme ซึ่งส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์กรดไขมันมากขึ้น

ซิเตรทจะเป็นตัวส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์กรดไขมัน ทั้งนี้เนื่องจากซิเตรทเป็นตัวพาเอา Acetyl CoA จากไมโตคอนเดรียออกมาสู่ไซโตพลาสซึม (บริเวณที่มีการสังเคราะห์กรดไขมัน) ซึ่งซิเตรทนี้มาจากไพรูเวทซึ่งได้มาจากวิถีไกลโคไลซิสโดยที่ซิเตรทจะกระตุ้นการทำงานของ Acetyl CoA carboxylase ในขบวนการต่อความยาวของคาร์บอนอะตอมของกรดไขมัน

ATP จะเร่งการสังเคราะห์กรดไขมันโดยเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ Acetyl CoA carboxylase เช่นกัน

2.4.2.3 **ตัวยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน**

ตัวยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน คือ ผลผลิตของกรดไขมัน เช่น free fatty acid และ fatty acyl CoA ซึ่งจะยับยั้งแบบย้อนกลับ (free back inhibition) โดยออกฤทธิ์ที่ Acetyl CoA carboxylase

จะเห็นว่า การควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมันนั้น จะมีการควบคุม 2 ทาง คือ กระตุ้นให้มีการสร้างและยับยั้งไม่ให้มีการสร้าง ซึ่งการควบคุมนี้จะแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์

## 2.5 ข้อดีของการใช้ยีสต์เป็นแหล่งไขมัน

ข้อดีของการใช้ยีสต์เป็นแหล่งไขมันได้แก่

1. ไขมันที่ได้สามารถพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม (higher-value added products) ซึ่งมีมูลค่าเพิ่มสูงกว่าไขมันทั่วไปที่ได้จากพืช

2. ยีสต์สามารถให้การผลิตไขมันได้คราวละมาก ๆ ในระยะเวลาสั้น ๆ โดยใช้วัตถุดิบที่ราคาถูกหรือเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม

3. กลไกการผลิตไม่ยุ่งยากซับซ้อน เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยว ซึ่งมีโครงสร้างอวัยวะไม่ยุ่งยากซับซ้อนเหมือนในพืชหรือสัตว์ทำให้สามารถควบคุมกลไกการผลิตให้อยู่ในสภาวะในช่วงที่เหมาะสมตามต้องการได้

4. สามารถนำความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมมาพัฒนาหาสายพันธุ์ที่ให้การผลิตผลิตภัณฑ์ไขมันที่มีความหลากหลายทำให้สามารถใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้เกิดประโยชน์กว้างขวางขึ้น (Rattray. 1984)

ไขมันที่ได้จากยีสต์ไขมันสูงสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มได้ เช่น ใช้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ เนยโกโก้ปกติผลิตได้จากเมล็ดของต้นโกโก้ (*Theobroma cacao*) ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไขมันที่ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ชนิด SUS (1,3-disaturated-2-unsaturated triglycerides) อยู่ในปริมาณมาก โดยเฉพาะไตรกลีเซอไรด์ชนิด SOP (1-stearoyl-2-oleoyl-3-palmitoyl triglycerides) และไตรกลีเซอไรด์ชนิด POP (1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl triglycerides) โดยเนยโกโก้จะประกอบด้วยกรดปาลมิติคร้อยละ 23-30 มีกรดสเตียริคร้อยละ 32-37 กรดโอเลอิคร้อยละ 30 -37 แต่น้ำมันที่ได้จากยีสต์จะมีกรดโอเลอิคสูงเกินไปประมาณร้อยละ 40-45 และมีกรดสเตียริคน้อยเกินไป คือ ประมาณร้อยละ 10 หรือน้อยกว่า จึงมีการทดลองเติมกรดสเตียริคหรือเอสเทอร์ของกรดสเตียริคในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงยีสต์เพื่อการผลิตไขมันเพื่อเพิ่มปริมาณกรดสเตียติคในองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ของเซลล์ยีสต์ หรือโดยการเติมตัวยับยั้งเอนไซม์ stearate delta 9 desaturase เช่นใช้ cyclopropene fatty acid

ซึ่งมีองค์ประกอบของ sterculic acid และ malvalic acid โดยตัวยับยั้งเอนไซม์นี้จะไม่มีผลไปลดปริมาณกรดลิโนเลอิคแต่จะมีผลในการยับยั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนกรดสเตียริคเป็นกรดโอเลอิค ทำให้ได้ไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่ดีมีกรดสเตียริคเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 40 ทำให้ องค์ประกอบของเนยโกโก้ที่ได้จากยีสต์เหมือนกับเนยโกโก้จากเมล็ดโกโก้ จึงอาจนำไปใช้ทดแทนเนยโกโก้จากพืช ซึ่งมีราคาแพงกว่า แต่การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์นี้จะมีความจำเพาะกับยีสต์ไขมันสูงแต่ละสปีชีส์ เช่น ยีสต์หลายสายพันธุ์ในตระกูล *Lipomyces* sp. จะไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม cyclopropene fatty acid ปริมาณ cyclopropene fatty acid ที่นิยมใช้อยู่ระหว่างร้อยละ 0.001-0.5 แต่จะนิยมมากกว่าในช่วงร้อยละ 0.01-0.2 (Gierhart. 1984) แหล่งของ cyclopropene fatty acid ก็เช่น น้ำมันจากเมล็ดนุ่นและน้ำมันจากเมล็ดฝ้าย เป็นต้น

Moreton (1985) ศึกษาการดัดแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันจากยีสต์ *Candida* sp. 107 *Trichosporon cutaneum* และ *Rhodosporidium toruloides* โดยใช้ cyclopropene fatty acid พบว่ากรดสเตียริคจะเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณ cyclopropene fatty acid ที่ใช้เพิ่มขึ้น ส่วนกรดโอเลอิคจะมีปริมาณลดลง แต่กรดลิโนเลอิคและกรดลิโนเลนิคจะไม่ได้รับผลกระทบ

Hussein *et al.* (1995) ได้ศึกษายีสต์ *Cryptococcus curvatus* ซึ่งจัดเป็นยีสต์ไขมันสูง (high-fat yeast : HFY) โดยทดลองใช้เป็นไขมันเสริมในสูตรอาหารไก่ แล้วพบว่ายีสต์นี้ไม่มีผลกระทบในทางลบใด ๆ ต่อคุณภาพของเนื้อไก่ และยังจะช่วยให้กรดโอเลอิคในเนื้ออกไก่ลดลงด้วย แต่ประสิทธิภาพในการย่อย HFY ในไก่นี้ค่อนข้างต่ำ

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูง เพื่อนำไปใช้เป็นสารไบโอเซอเฟกแตนท์ เช่น Davila *et al.* (1992) พบว่า *Candida bombicola* CBS 6009 สามารถให้การผลิต sophorose lipid Albrecht *et al.* (1996) ค้นพบ *Candida bombicola* ATCC 22214 ซึ่งให้การผลิต sophorose lipid และ ไกลโคลิปิด (glycolipid)

Kim *et al.* (1997) พบเชื้อ *Torulopsis bombicola* ซึ่งผลิต sophorose lipid โดยไขมันดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้เป็นสารไบโอเซอเฟกแตนท์

## 2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูง

การเปลี่ยนสับสเตรทเป็นไขมันของยีสต์มีขั้นตอนที่สำคัญคือ มีการเลี้ยงเพื่อให้เกิดการเจริญหลังจากนั้นเซลล์จะมีการผลิตไขมัน โดยจะมีการเปลี่ยนคาร์บอนให้เป็นไขมัน เพื่อให้ได้การผลิตที่เหมาะสมต้องควบคุมปัจจัยและสภาวะที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสม ปัจจัยและสภาวะที่เกี่ยวข้องได้แก่ อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของสับสเตรท พีเอช ปริมาณออกซิเจน อัตราการเจริญและปริมาณความเข้มข้นของสารอาหารที่จำเป็น เป็นต้น

### 2.6.1 อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของสับสเตรท

อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่ำมักจำเป็นเพื่อใช้เพิ่มปริมาณเซลล์ในช่วงแรกของการเจริญ แต่ในช่วงหลังเป็นการเปลี่ยนคาร์บอนให้เป็นไขมันต้องใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง เนื่องจากในช่วงการผลิตไขมันยีสต์ต้องการปริมาณคาร์บอนสูงเพื่อเปลี่ยนเป็นไขมัน ปริมาณเซลล์และไขมันที่ได้จากยีสต์ไขมันสูงขึ้นกับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (Granger *et al.* 1993) อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเหมาะสม คือ ที่มากกว่า 10:1 และจะเหมาะสมยิ่งขึ้นถ้าใช้ที่อัตราส่วนประมาณมากกว่า 50:1 (Gierhart. 1984 ; Hammond and Glatz. 1988 ; Ratledge and Evans. 1989)

อัจฉราวรรณ ทองมี (2530) ศึกษาการสกัดไขมันจากยีสต์ *Rhodotorula gracilis* พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 75 จะให้ปริมาณกรดไขมันมากที่สุด คือ ร้อยละ 34.2 โดยน้ำหนักแห้ง และที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 37 จะให้ปริมาณการผลิตไขมันสูงสุดคือ 1.9 กรัมต่อลิตร องค์ประกอบหลักที่พบคือ กรดปาลมิติคร้อยละ 38 กรดโอเลอิคร้อยละ 27 กรดสเตียริคร้อยละ 13 และกรดปาลมิโตเลอิคร้อยละ 11 โดยวัดอัตราการเจริญของยีสต์โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และสกัดไขมันออกจากเซลล์ยีสต์โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยด่าง (0.5 M KOH ในเอทธานอลร้อยละ 80) และใช้วิธีการหาปริมาณไขมันทั้งหมด โดยวิธี colorimetic method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร วิธีนี้สามารถหาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดได้เช่นเดียวกับการใช้แก๊สโครมาโตกราฟฟี ส่วน Yoon and Rhee (1983) ศึกษาการผลิตไขมันจาก *Rhodotorula glutinis* (*gracilis*) เช่นกันโดยพบว่าในการหมักแบบต่อเนื่องภายใต้สภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจน การผลิตไขมันจะเกิดมากที่สุดเมื่ออัตราการเจือจางต่ำที่สุด โดยอัตราการผลิตไขมันจะอยู่ที่ 16.4 กรัมต่อ 100 กรัมกลูโคสที่ถูกใช้ไป เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น ปริมาณเซลล์ ปริมาณไขมัน อัตราการผลิตไขมัน และไขมันผลิตภัณฑ์จะลดลงแต่ไกลโคลิปิดและฟอสโฟลิปิดจะให้ลักษณะที่ตรงข้าม ไขมันที่เป็นกลางที่สำคัญที่มีการผลิตก็ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ สเตอริลเอสเทอร์ และสเตอรอล ฟอสโฟลิปิดที่พบ เช่น ฟอสฟาทิดิลซีรีน (phosphatidylserine) เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsatturated fatty acid) จะเพิ่มขึ้น แต่กรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวของไขมันจะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการเจือจางลดลงขึ้น สำหรับการหมักแบบต่อเนื่องภายใต้สภาวะจำกัดปริมาณคาร์บอน พบว่าปริมาณเซลล์จะลดลงเมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณไขมันที่ได้ค่อนข้างคงที่

Park *et al.* (1990) พบว่ายีสต์ *Apiotrichum curvatum* (*Candida curvata* D) ผลิตไขมันได้ถึงร้อยละ 60 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนจะผลิตไขมันได้ร้อยละ 54 โดยน้ำหนักแห้ง และจะผลิตไขมันได้ร้อยละ 20-25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสมดุลของคาร์บอนและไนโตรเจน (balance medium) เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนแหล่งคาร์บอน เซลล์จะใช้ไขมันภายในเซลล์และคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งของพลังงานทำให้ปริมาณไขมันและคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ลดลง ซึ่งปกติคาร์โบไฮเดรตจะเป็นสารตัวกลางที่จะใช้ในขบวนการผลิตไขมัน เมื่อไขมันภายในเซลล์ถูกเมแทบอลิซึมจะทำให้เอนไซม์แคตาเลส (catalase) ถูกเหนี่ยวนำให้มีกิจกรรม ปริมาณไขมันภายในเซลล์จึงมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกันกิจกรรมของเอนไซม์แคตาเลส ปริมาณโปรตีน หรือปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดภายในเซลล์

Hausson and Dostalek (1986) พบว่ายีสต์ *Cryptococcus albidus* var. albidus CBS 4517 ผลิตไขมันได้ทั้งภายใต้สภาวะจำกัดปริมาณคาร์บอนและภายใต้สภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจน แต่ที่สภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะให้การผลิตมากกว่า และมีอัตราการผลิตสูงสุดที่ 37 มิลลิกรัมไขมันต่อกรัมยีสต์ต่อชั่วโมง ได้ไขมันร้อยละ 46.3 โดยน้ำหนักแห้ง

Ykema *et al.* (1988) ศึกษาการผลิตไขมันของยีสต์ *Apiotrichum curvatum* โดยใช้เวย์โปรตีน (whey protein) พบว่าปริมาณไขมันที่ได้จะคงที่อยู่ที่ร้อยละ 22 โดยน้ำหนักแห้งเมื่ออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนประมาณ 25 และเพื่อให้ได้อัตราการผลิตไขมันสูงขึ้นควรจะให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ในช่วง 30-35 เมื่อทดลองใช้วิธีการหมักแบบแบท แบบเฟด-เบช แบบต่อเนื่อง และแบบการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ แบบการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่จะให้อัตราการผลิตไขมันจะสูงสุดที่ประมาณ 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นเป็น 2.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเมื่อให้ออกซิเจนในอัตราส่วนที่เหมาะสม

Granger *et al.* (1992) พบว่าอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อคาร์บอน (N/C ratio) และอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตไขมันของยีสต์ไขมันสูง *Rhodotorula glutinis* NRRLY 1091 การเลี้ยงภายใต้สภาวะการจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะส่งผลให้ปริมาณการผลิตไขมันเพิ่มขึ้น แต่จะไปลดปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยพบว่าที่อัตราส่วนไนโตรเจนต่อคาร์บอนเท่ากับ 0.025 จะให้การผลิตไขมันสูงสุด แต่ในสภาวะที่ไนโตรเจนไม่ได้ถูกจำกัดปริมาณ (ไนโตรเจนต่อคาร์บอนมากกว่า 0.14) เซลล์จะเจริญดีที่อุณหภูมิต่ำและจะให้ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

Prapulla *et al.* (1992) พบว่าใน *Rhodotorula gracillis* CFR-1 จะให้การผลิตไขมันสูงสุดเมื่อใช้คาร์บอนร้อยละ 10.24 ไนโตรเจน 0.37 กรัมต่อลิตร และหัวเชื้อร้อยละ 20

Leman (1997) กล่าวว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในการสะสมไขมันของเซลล์ยีสต์อยู่ที่ประมาณ 40 : 1

### 2.6.2 แหล่งคาร์บอน

คาร์โบไฮเดรตที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีได้แก่ น้ำตาลอัลโดส เช่น กลูโคส เฮกโซส หรือเป็นไดแซกคาไรด์ เช่น มอลโตส ซูโครส หรือจะเป็นอนุพันธ์ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้ง หรืออาจเป็นกลีเซอรอลก็ได้ แหล่งคาร์บอนที่เติมประมาณร้อยละ 0.1-5 โดยน้ำหนัก (Gierhart.1984 ; Naganuma *et al.* 1985)

Dostalek (1986) ศึกษาการผลิตไขมันจากแป้งโดยใช้การหมักแบบหัวเชื้อผสม (mix culture) วิธีหมักแบบเฟด-เบชของยีสต์ *Saccharomyces fibuliger* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายแป้งและ *Rhodosporidium toruloides* ซึ่งไม่เจริญในแป้งแต่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสับสเตรทที่ได้จากการย่อยสลายแป้งของ *Saccharomyces fibuliger* ไปเป็นไขมัน เมื่อปริมาณไนโตรเจนลดลงปริมาณเซลล์ทั้งหมดก็จะลดลง แต่ *Rhodosporidium toruloides* จะเพิ่มขึ้น เมื่อใช้ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นเป็น 0.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันสูงสุดที่ได้คือ 9.7 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตไขมันสูงสุดคือ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณไขมันสูงสุดร้อยละ 36.5 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไขมันของการหมักแบบหัวเชื้อผสมกับการหมักแบบหัวเชื้อเดี่ยวของ *Lipomyces starkeyi* และของ *Aspergillus oryzae* พบว่าการหมักแบบหัวเชื้อผสมจะมีการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไขมันที่ต่ำกว่าการหมักแบบหัวเชื้อเดียวแต่ให้อัตราการผลิตไขมันที่สูงกว่า Hasson and Dostalek (1986) พบว่า *Cryptococcus albidus* var. albidus เจริญในอาหารที่ใช้แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง พีเอชเท่ากับ 5.5 จะได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 4.7 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 33.1 โดยน้ำหนักแห้ง

Fall *et al.* (1984) ศึกษาการใช้ไซแลนเป็นสับสเตรทในการผลิตไตรกลีเซอไรด์ในสภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจน พบว่าระหว่างยีสต์ *Candida Cryptococcus Lipomyces Rhodosporidium Rhodotorula* และ *Trichosporon* ยีสต์ *Cryptococcus* สามารถเปลี่ยน 100 กรัมของดี-ไซโลสได้เป็นไตรกลีเซอไรด์ 17-23 กรัม ไตรกลีเซอไรด์ที่ได้ใช้เป็นน้ำมันดีเซล *Cryptococcus albidus* สามารถใช้ไซแลนได้เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสย่อยสลายไซแลน ส่วน *Cryptococcus terricolus* ไม่มีเอนไซม์ไซแลนเนสแต่สามารถเปลี่ยนไซแลนเป็นไตรกลีเซอไรด์ได้เมื่อมีการเติมเอนไซม์ไซแลนเนสลงไป

Hausson and Dostalek (1986) ศึกษาการผลิตไขมันในยีสต์ *Cryptococcus albidus* var. albidus CBS 4517 พบว่าเมื่อใช้กลูโคส มอลโตส หรือแมนนิทอล เป็นแหล่งคาร์บอน กลูโคสจะให้ผลผลิตสูงสุด Glatz *et al.* (1985) พบว่า *Candida curvata D* สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของกล้วยที่สุกงอมแล้วให้การผลิตไขมันได้ แต่ปริมาณที่ได้นั้นต่ำ

เนื่องจากในกล้วยสุกยังมีน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนน้อยเกินไป เช่นเดียวกับ Vega *et al.* (1988) พบว่า *Apiotrichum curvatum* ATCC 20509 สามารถเจริญในน้ำกล้วยแล้วให้การผลิตไขมันโดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือเมื่อการเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำกล้วยร้อยละ 25 ทำการพรีทรีตเมนต์ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิสเตอริไลส์ เมื่อเสริมแอสพาราจินและเกลือแร่ในสูตรอาหารจะช่วยในการใช้แหล่งคาร์บอนในน้ำกล้วยได้ดีขึ้น ส่วน Akindumila and Glatz (1998) ได้นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์เดียวกันนี้ไปเลี้ยงในน้ำมะเขือเทศ พบว่าจะได้ไขมันสูงสุดที่ 12.97 กรัมต่อลิตร เมื่อเสริมน้ำตาลทรายร้อยละ 16 แต่ถ้าไม่เสริมน้ำตาลทรายจะได้ไขมันเพียง 10.13 กรัมต่อลิตร

มีการศึกษาพบว่า ผลผลิตจะสูงขึ้นเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งมีกรดไขมันหนึ่งชนิดหรือมากกว่าเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากน้ำมันมีคาร์บอนต่อโมลสูงกว่าคาร์โบไฮเดรตแต่มีการละลายได้น้อยกว่าจึงต้องเติมสารอิมัลซิไฟเออร์ช่วยเพิ่มการละลาย มักนิยมสารอิมัลซิไฟเออร์ที่มีค่า HLB มากกว่า 15 ขึ้นไป โดยสารอิมัลซิไฟเออร์ต้องเป็นชนิดที่ใช้กับอาหารซึ่งไม่มีผลกระทบต่อการเมแทบอลิซึมไขมันของเซลล์ ปริมาณที่ใช้อยู่ระหว่างร้อยละ 0.001-1 โดยน้ำหนัก โดยกรดไขมันที่ใช้จะมีคาร์บอนอะตอมอยู่ระหว่าง 10-20 อะตอม เช่น อิมัลชั่นของกรดปาลมิติค กรดโอเลอิค และกรดสเตียริค เพื่อให้ได้ไตรกลีเซอไรด์ที่มีความจำเพาะเจาะจงตามความต้องการควรเติมน้ำมันที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดนั้น ๆ ลงไปร้อยละ 10-40 ของปริมาณคาร์บอนทั้งหมด หรืออาจใช้ในปริมาณมากกว่านี้ก็ได้ (Gierhart. 1984)

Bati *et al.* (1984) พบว่า *Candida lipolytica* สามารถใช้น้ำมันเป็นแหล่งของคาร์บอน การผลิตไขมันจะลดลงถ้ามีไนโตรเจนมากเกินไป น้ำมันข้าวโพดที่ใช้เป็นสับสเตรทจะถูกใช้ในอัตรา 18 กรัมต่อลิตรภายใน 72 ชั่วโมง ถ้าเพิ่มปริมาณสับสเตรทให้มากกว่า 18 กรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ไขมันร้อยละ 60 ซึ่งจะเป็นไขมันจากสับสเตรทประมาณร้อยละ 45-57 องค์ประกอบของกรดไขมันที่ได้จะเหมือนกับไขมันหรือน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรท ไขมันที่ได้มีส่วนที่เป็นสเตอรอลและมีกรดไขมันอิสระสูงแต่ไม่มีวิตามินอี Shimizu *et al.* (1989) พบว่ารา *Mortierella* ซึ่งเป็น arachidonic acid producing สามารถเปลี่ยนน้ำมันที่มีแอลฟาลิโนเลนิคเป็นองค์ประกอบให้เป็นน้ำมันที่มี EPA เป็นองค์ประกอบได้ โดยพบว่าน้ำมันลินสีด (linseed oil) ซึ่งอุดมด้วยแอลฟาลิโนเลนิคถึงร้อยละ 60 ของไขมันทั้งหมดนั้นเหมาะสมสำหรับการผลิต EPA ที่สุด โดยพบว่า *Mortierella alpina* 20-17 เปลี่ยนแอลฟาลิโนเลนิคร้อยละ 5.1 ของน้ำมันที่เติมในสูตรอาหารไปเป็น EPA ได้ 41.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

มนูเทพ กนกศิลป์ (2533) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไขมันในยีสต์ *Rhodotorula gracilis* พบว่าสบู่น้ำมันปาล์ม 1.0 กรัมต่อลิตร เพิ่มการผลิตไขมัน โดยองค์ประกอบของกรดไขมันที่ได้จะคล้ายกับน้ำมันปาล์มที่ใช้

Meesters and Huijberts (1996) พบว่ายีสต์ *Cryptococcus curvatus* สามารถผลิตไขมันโดยใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเตรท โดยจะให้ปริมาณเซลล์สูงถึง 118 กรัมต่อลิตร ใน 50 ชั่วโมงของการหมักและให้ปริมาณไขมันร้อยละ 25 โดยน้ำหนักแห้ง องค์ประกอบหลักของไขมันที่พบคือ กรดลิโนเลอิค กรดสเตียริค และกรดโอเลอิค

Kim *et al.* (1997) พบว่ายีสต์ *Torulopsis bombicola* ให้การผลิตไบโอเซอเฟกแตนท์ได้ดีเมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำตาลกลูโคส ซึ่งก็สอดคล้องกับ Davila *et al.* (1992) ซึ่งพบว่าเมื่อใช้เอทธิลเอสเทอร์ของน้ำมันเมล็ดเรพซีด (rapseed oil) ร่วมกับกลูโคส *Candida bombicola* CBS 6009 สามารถผลิต sophorose lipid ได้ ส่วน Hatzinkolaou *et al.* (1999) พบว่า *Rhodotorula glutinis* สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

### 2.6.3 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ก็เช่น แอสพาราจีน กลูตามิค เปปโตน หรือเกลือของแอมโมเนียมหรือยูเรีย จะเติมประมาณร้อยละ 0.005-1 โดยน้ำหนัก (Gierhart. 1984) Evans and Ratledge (1984) พบว่าในยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* CBS 14 เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ปริมาณไขมันร้อยละ 18 โดยน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อใช้กลูตาเมตยูเรีย หรืออาจินีน จะทำให้ได้ไขมันสูงขึ้นเป็นร้อยละ 50 ซึ่งก็สอดคล้องกับ Akindumila and Glatz (1998) พบว่าในยีสต์ *Apiotrichum curvatum* ATCC 20509 ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักแห้งจะสูงสุดเมื่อใช้ยูเรียร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วน Bati *et al.* (1989) พบว่าปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับ *Candida lipolytica* 1094 จะอยู่ที่ประมาณ 124 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการทดลองของ Hausson and Dostalek (1986) พบว่าแหล่งของไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ หรือแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเปรียบเทียบกับยูเรีย และการเติมกรดซิเตรทลงไปในสูตรอาหารที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนจะช่วยเพิ่มปริมาณไขมัน

จะเห็นว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมนั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ นอกจากนี้ในสูตรอาหารควรมีการเติมแร่ธาตุที่จำเป็นในปริมาณที่จำกัด เช่น เกลือของโปตัสเซียม แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม และเหล็กเป็นต้น (Ratledge and Evans. 1989; Granger *et al.* 1992) Granger *et al.*(a) (1993) พบว่าการผลิตไขมันและแอลฟาลิโนเลนิคจะถูกเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเมื่ออยู่ในสภาพจำกัดปริมาณฟอสฟอรัส ไนโตรเจน สังกะสีและเหล็ก ส่วนพวกวิตามินและกรดอะมิโนจะมีความจำเป็นรองลงมา ซึ่งมักจำเป็นกรณีต้องการยืดเวลาการหมักให้ยาวนานขึ้น Yongmanitchai and Ward (1991) พบว่าใน *Phaeodactylum tricornutum* การผลิต EPA จะเพิ่มขึ้นเมื่อเสริมด้วยวิตะมินบี 12

มนูเทพ กนกศิลป์ (2533) พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไขมันของยีสต์ *Rhodotorula gracilis* คือเมื่อเติมโปตัสเซียมไซยาไนด์ในอาหารสังเคราะห์ 1 กรัมต่อลิตร จะทำ

ให้ปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น การเติมไทอะมินและไบโอติน 0.1 กรัมต่อลิตร ไม่เพิ่มการเจริญและการสะสมไขมัน แต่ทำให้องค์ประกอบของกรดไขมันเปลี่ยนแปลงคือ ไบโอตินทำให้กรดโอเลอิคเพิ่มขึ้น แต่ไทอะมินจะทำให้กรดโอเลอิคลดลง อินออแกนนิคแคตอิออน (ซิงค์คลอไรด์ หรือแมงกานีสคลอไรด์) 0.1 กรัมต่อลิตรไม่เพิ่มการเจริญและการผลิตไขมันแต่ทำให้กรดโอเลอิคเพิ่มขึ้น

Naganuma *et al.* (1985) พบว่าในยีสต์ *Lipomyces starkeyi* ถ้าไม่มีการเติม $NH^{4+}$, $K^{+}$, $Mg^{2+}$, $PO_4^{3-}$, $SO_4^{2-}$,$Zn^{2+}$, $Fe^{3+}$ หรือ $Mn^{2+}$ จะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ลดลง ส่วน $Na^{+}$, $Cl^{-}$, $Cu^{2+}$, $BO_3^{3-}$, $I^{-}$, $MoO_4^{2-}$ และไบโอติน ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณเซลล์และปริมาณไขมัน

### 2.6.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตจะมีผลกระทบต่อจำนวนคาร์บอนอะตอมและปริมาณความไม่อิ่มตัวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์ อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตจะอยู่ที่ประมาณ 24-40 องศาเซลเซียส (Gierhart. 1984) สำหรับในช่วงอุณหภูมินี้ถ้าอุณหภูมิสูงจะทำให้มีการผลิตไขมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัว แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำจะมีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว Granger *et al.* (1992) พบว่าที่อุณหภูมิต่ำ *Rhodotorula glutinis* NRRLY1091 จะผลิต polyunsaturated fatty acid (PUFA) ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง โดยที่ 25 องศาเซลเซียส จะให้การผลิตแอลฟาลิโนเลนิคสูงสุด Becker (1994) พบว่า *Porphyridium* sp. ที่ 16 องศาเซลเซียส จะมีการผลิต arachidonic acid (AA) ได้ดีกว่าที่ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณการผลิตที่ได้เท่ากับร้อยละ 60 และ 16 ของไขมันทั้งหมด ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจาก desaturating enzymes และ elongation enzymes นั้นมีความไวต่ออุณหภูมิ Kates and Baxter (1962) พบว่าใน psychrophilic yeast จีนัส *Candida* ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับ mesophilic yeast (*Candida lipolytica*) ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 10 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณการผลิตไขมันใกล้เคียงกัน ชนิดของไขมันที่ได้คล้ายคลึงกัน จะเห็นว่า psychrophilic และ mesophilic ที่เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณกรดไขมันลิโนเลอิคสูงกว่าและมีกรดโอเลอิคต่ำกว่า mesophilic yeast ที่เจริญที่ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณกรดลิโนเลอิคใน psychrophilic จะคงที่ตลอดช่วงการเจริญ แต่ใน mesophilic yeast ที่เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของกรดโอเลอิค จึงเห็นว่าในระยะสุดท้ายของการเจริญที่ 10 องศาเซลเซียส จะมีกรดลิโนเลอิคสูงกว่าที่ 25 องศาเซลเซียส

Moon *et al.* (1978) ศึกษาการผลิตไขมันของ *Candida curvata* และ *Trichosporon cutaneum* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตคือที่ 28-33 องศาเซลเซียส

Hausson and Dostalek (1986) ศึกษาการผลิตไขมันของ *Cryptococcus albidus* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตอยู่ที่ 20 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 25

และ 30 องศาเซลเซียส Ratledge and Hall (1977) พบว่า *Candida* sp. 107 จะผลิตไขมันสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อหมักแบบสองขั้นตอน แต่จะผลิตไขมันสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อหมักแบบขั้นตอนเดียว

Hammond and Glatz (1988) พบว่ายีสต์ *Candida lipolytica* 1094 ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูง โดยอุณหภูมิเหมาะสมอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส จึงเป็นข้อจำกัดที่จะนำไปใช้กับสับสเตรทที่ราคาถูกแต่ต้องใช้สภาวะอุณหภูมิสูง เช่นในไขวัว เป็นต้น

Granger *et al.* (b) (1993) พบว่ายีสต์ *Rhodotorula glutinis* เมื่อลดอุณหภูมิลงจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส จะทำให้การผลิตไขมันลดลง แต่จะช่วยให้กรดไขมันแอลฟาลิโลเลนิคเพิ่มขึ้น ส่วน Suutari *et al.* (1996) ก็พบว่า *Lipomyces starkeyi* DM 70295 เมื่ออุณหภูมิลดลงจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 20 องศาเซลเซียสจะทำให้ปริมาณกรดลิโนเลนิคเพิ่มขึ้น แต่ที่ 10 องศาเซลเซียส ไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณกรดลิโนเลนิค Suutari *et al.* (1990) พบว่าใน *Rhotorula toruloides* เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงกว่า 20 ถึง 26 องศาเซลเซียส จะทำให้ดีกรีของความไม่อิ่มตัวลดลงแต่ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดจะเพิ่มขึ้น

Suutari *et al.* (1993) พบว่า *Lipomyces starkeyi* จะผลิตไขมันสูงสุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับ Naganuma *et al.* (1985) ที่พบว่ายีสต์ *Lipomyces starkeyi* มีการผลิตไขมันมากที่สุดที่ 25.5-29.5 องศาเซลเซียส โดยเมื่ออุณหภูมิช่วงการผลิตไขมันลดลงจะทำให้กรดโอเลอิคเพิ่มขึ้นแต่กรดปาลมิติคจะลดลง ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะสูงสุดที่อุณหภูมิน้อยกว่า 15 องศาเซลเซียส Randhir *et al.* (1987) พบว่า *Bacillus subtilis* (MTCC 2423 และ MTCC 1427) ให้การผลิตไบโอเซอเฟกแตนท์ได้เมื่อใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรท

Shirasaka and Shimizu (1995) พบว่าเชื้อรา *Saprolegnia* sp. 28 YTF-1 สามารถผลิตกรดไขมัน EPA ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

### 2.6.5 ความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช)

ค่าพีเอชจะมีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยต่อทั้งปริมาณและชนิดของกรดไขมัน ค่าพีเอชที่ใช้ในการหมักจะอยู่ที่พีเอช 5.4-8.5 มีการศึกษาพบว่าถ้าพีเอชมากกว่า 9.0 จะให้การผลิตไม่ดี โดยพีเอชช่วงเหมาะสมมักขึ้นกับชนิดของยีสต์ Moon *et al.* (1978) ศึกษาการผลิตไขมันของ *Candida curvata* และ *Trichosporon cutaneum* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมคือช่วง 5.4-5.8 ซึ่งก็สอดคล้องกับ Hammond *et al.* (1985) Floetenmeyer *et al.* (1985) และ Glatz *et al.* (1985) ส่วน Naganuma *et al.* (1985) พบว่ายีสต์ *Lipomyces starkeyi* มีการผลิตไขมันดีที่สุดที่พีเอช 4.9 Davies *et al.* (1985) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไขมันของ *Apiotrichum curvatum* คือที่พีเอช 4.0 แต่ Ykema *et al.* (1985) ศึกษาเชื้อเดียวกันนี้แต่ใช้

สภาวะการผลิตเหมาะสมที่พีเอช 4.8 จะเห็นว่าโดยทั่วไปพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไขมันคือที่พีเอช 5.5 (มนูเทพ กนกศิลป์. 2533 ; Hall and Ratledge. 1977 ; Yoon and Rhee. 1983 ; Moeton. 1985 ; Hasson and Dostalek. 1986 ; Suutari *et al.* 1993)

### 2.6.6 ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนมีผลกระทบบ้างเล็กน้อยต่อการเจริญและการเพิ่มปริมาณเซลล์ การผลิตไขมันของยีสต์มีความต้องการปริมาณออกซิเจนต่ำ เนื่องจากการสังเคราะห์ไขมันเกิดจากปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน และเพราะยีสต์ไขมันสูงมีอัตราการเจริญน้อยกว่าการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว จึงมีความจำเป็นในการใช้ออกซิเจนที่น้อย แต่พบว่าในระบบแอโรบิคจะทำให้ปริมาณไขมันผลิตภัณฑ์มีค่าเพิ่มขึ้น (Gierhart. 1984) ปริมาณออกซิเจนต้องเพียงพอเพื่อให้เซลล์เจริญ คือประมาณ 1-3 โมลต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง โดยช่วงที่มีการเปลี่ยนคาร์บอนให้เป็นไขมันจะต้องการออกซิเจนประมาณ 13 โมลต่อลิตรต่อชั่วโมง

Davies *et al.* (1990) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อกระบวนการผลิตไขมันของยีสต์ *Apiotrichum curvatum* ATCC 20509 ซึ่งใช้เคซีนเป็นสับสเตรท พบว่าที่ระดับออกซิเจน 4-5 มิลลิโมลต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็นระดับที่จะทำให้การหมักเกิดขึ้นได้ดี โดยได้ปริมาณกรดโอเลอิคร้อยละ 45 และกรดลิโนเลอิคจะอยู่ที่ร้อยละ 5 และพบว่าในช่วงของการผลิตไขมันถ้าให้ออกซิเจนในปริมาณต่ำจะทำให้มีปริมาณกรดสเตียริคเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 23 ทำให้องค์ประกอบของกรดไขมันที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับน้ำมันปาล์ม ซึ่งอาจปรับปรุงเป็นไขมันใช้แทนเนยโกโก้ได้ จากการศึกษายีสต์ *Rhodotorula gracilis* มีรายงานว่าที่ปริมาณออกซิเจนต่ำ ปริมาณกรดไขมันชนิดอิ่มตัวจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ $\Delta$ 9 desaturase ซึ่งจะเปลี่ยนกรดสเตียริคเป็นกรดโอเลอิคเป็นเอนไซม์ชนิดโมโนออกซีจีเนส (monooxygenase) ซึ่งต้องการ 1 โมเลกุลของออกซิเจน เพื่อลดความอิ่มตัวของกรดสเตียริคลง 1 โมเลกุล แต่ที่ระดับออกซิเจนต่ำนี้จะมีผลให้ช่วงเวลาการหมักยาวนานขึ้น และค่าสัมประสิทธิ์ของการผลิตไขมันมีค่าต่ำ Naganuma *et al.* (1985) พบว่ายีสต์ *Lipomyces starkeyi* เป็นยีสต์ที่ต้องการออกซิเจนสูง (high areobic yeast) เนื่องจากที่ระดับออกซิเจนต่ำจะทำให้ปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันลดลง

### 2.6.7 ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต

ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตที่ดีควรอยู่ในช่วง 2-5 วัน (Gierhart. 1984) การผลิตไขมันภายในเซลล์ยีสต์จะเริ่มขึ้นในช่วงการเพิ่มอัตราการเจริญ (exponential phase) จนถึงช่วงสุดท้ายของการเจริญระยะคงที่ (late stationary phase) คือประมาณ 10 วัน (Hammond and Glatz. 1988)

Misra *et al.* (1984) พบว่ายีสต์ *Rhodotorula glutinis* (*gracilis*) เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้เวลาในการหมัก 42 ชั่วโมง ได้ไขมัน 2.3 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์เท่ากับ

5.3 กรัมต่อลิตร ส่วนอัจฉราวรรณ ทองมี (2530) ศึกษาการผลิตไขมันของยีสต์ *Rhodotorula gracilis* เช่นกันแต่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ายีสต์จะเข้าสู่สเตชั่นนารีเฟสเมื่อเวลา 28-32 ชั่วโมง การผลิตไขมันจะเกิดขึ้นตลอดเวลาการเจริญและปริมาณไขมันจะคงที่เมื่อเข้าสู่สเตชั่นนารีเฟส มนูเทพ กนกศิลป์ (2533) ได้ทดลองยืดเวลาการเลี้ยงยีสต์ *Rhorotorula gracilis* ออกไปเป็น 72 ชั่วโมง พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์หรือการผลิตไขมันจากการศึกษาของ Akindoumila and Glatz (1998) พบว่าในยีสต์ *Apiotrichum curvatum* ATCC 20509 เลี้ยงในน้ำมะเขือเทศผสมกลูโคสภายใต้สภาวะควบคุมในถังหมักจะให้การผลิตไขมันสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง แต่จะต้องใช้เวลา 130 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในเครื่องเขย่า

## 2.7 การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตไขมันโดยใช้ยีสต์ไขมันสูง

เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตจึงได้มีการศึกษาการใช้วัตถุดิบราคาถูกมาทำการผลิต แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทราคาถูกที่มีมากในเมืองไทย ราคาหน้าโรงงานในปี พ.ศ. 2540 ประมาณ 5-5.50 บาทต่อกิโลกรัม ถ้านำมาใช้ผลิตไขมันจากยีสต์จึงน่าจะช่วยลดต้นทุนการผลิตและเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าของสินค้าเกษตรได้อีกทางหนึ่ง แป้งมันสำปะหลังเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยแอนไฮโดรกลูโคส (anhydroglucose unit, AGU) มาเชื่อมต่อเป็นสายโมเลกุลเส้นตรงด้วยพันธะกลูโคซายด์ (glucoside bond) แบบ D-(1,4) เรียกว่า อะไมโลส และถ้ามีการเชื่อมแบบโซ่กิ่งที่ D-(1,6) ด้วยจะเรียกว่า อะไมโลเพคติน แป้งมันสำปะหลังประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในอัตราส่วนโดยประมาณ 22 : 78 แป้งดิบจะประกอบด้วยเม็ดแป้ง (starch granule) ซึ่งไม่ละลายน้ำและทนต่อปฏิกิริยาเคมีและเอนไซม์เนื่องจากมีการรวมตัวกันของลูกโซ่อะไมโลสและอะไมโลเพคตินด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ต้องทำการเจลาติไนส์ (gelatinization) ให้เม็ดแป้งแตกตัวและละลายน้ำ น้ำแป้งก็จะสามารถทำปฏิกิริยาเคมีและถูกย่อยด้วยเอนไซม์ การเจลาติไนส์ทำโดยการนำแป้งมาเติมน้ำแล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เม็ดแป้งก็จะพองตัวและฟอร์มเป็นสารละลายใสที่มีความข้นหนืดสามารถทำปฏิกิริยาเคมีและถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้นการใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งดิบได้โดยตรงจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการนำแป้งดิบไปใช้ประโยชน์ พบว่าแหล่งของเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ที่สำคัญคือ เอนไซม์จากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ รา แบคทีเรีย และยีสต์ เช่น จากรา *Aspergillus* sp. จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. *Clostridium* sp. หรือจากยีสต์ *Lipomyces* sp. เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ที่สำคัญคือ แอลฟา-อะไมโลส และเอนไซม์กลูโคซิเดส (William and Kelly, 1990)

Punpeng *et al.* (1992) แยกได้ยีสต์ *Lipomyces starkeyi* HN-606 จากลูกแป้ง ยีสต์นี้สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่ย่อยแป้งดิบได้

## 2.8 การสกัดและวิเคราะห์กรดไขมันในเซลล์ยีสต์ไขมันสูง

### 2.8.1 วิธีการสกัดไขมันและกรดไขมัน

ในธรรมชาติกรดไขมันจะอยู่ในรูปเอสเทอร์ในรูปไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิปิดซึ่งมักอยู่รวมกับสารอื่น ๆ เช่น โปรตีน ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต ส่วนกรดไขมันอิสระนั้นจะพบในปริมาณเพียงเล็กน้อย

การละลายของไขมันซึ่งส่วนใหญ่คือ ไตรกลีเซอไรด์นั้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนคาร์บอนอะตอมที่เป็นองค์ประกอบ ถ้าไขมันประกอบด้วยคาร์บอนสายสั้น ๆ จะสามารถละลายในตัวทำละลายประเภทมีขั้วได้ แต่ถ้าไขมันมีคาร์บอนสายยาวเป็นองค์ประกอบจะละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้วได้ดี เช่น เฮกเซน เบนซิน และอาจละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้วได้เล็กน้อย

เนื่องจากไขมันในยีสต์จะอยู่ในรูปหยดไขมันเล็ก ๆ ภายในเซลล์ต้องมีการทำให้เซลล์แตกก่อนจึงสกัดไขมันออกมาได้ Sobus and Holmlund (1975) ได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดไขมันในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* MY 306 โดยวิธีต่าง ๆ แล้วพบว่าในการสกัดไขมันในเซลล์ซึ่งไม่ได้ผ่านการทำให้เซลล์แตกหัก การสกัดโดยใช้เมทธานอล การใช้เมทธานอล : เบนซีน (1 : 1 โดยปริมาตร) และการใช้เบนซีน สามารถสกัดไขมันออกมาได้ดี

Grima *et al.* (1994) ศึกษาวิธีการสกัดไขมันในสาหร่าย *Isochrysis galbana* 7 วิธี คือ ใช้คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล : น้ำ (1 : 2 : 0.8) เฮกเซน : เอทธานอลร้อยละ 96 (1 : 2.5) เฮกเซน : เอทธานอลร้อยละ 96 (1 : 0.9) บิวทานอล เอทธานอลร้อยละ 96 เอทธานอลร้อยละ 96 : น้ำ (1 :1) และเฮกเซน : ไอโซโพรพานอล (1 : 1.5) พบว่าวิธีที่สกัดไขมันได้ดีคือการใช้คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล : น้ำ (1 :2 : 0.8) รองลงมาคือ การใช้เอทธานอลร้อยละ 96 และการใช้เฮกเซน : เอทธานอลร้อยละ 96 (1 : 2.5) ตามลำดับ

ในการสกัดไขมันภายในเซลล์จุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้ของผสมของตัวทำละลายที่มีอัลกอฮอล์อยู่ด้วยเพื่อช่วยในการทำละลายพันธะไฮโดรเจนและแรงดึงอิออนิกระหว่างไขมันกับโปรตีน

Moon and Hammond (1978) ได้ทดลองสกัดไขมันจาก *Candida curvata* ด้วยวิธีต่าง ๆ แล้วพบว่าการสกัดด้วยเมทธานอล : เบนซีน (1:1) ตามวิธีของ Sobus and Holmlund (1975) นั้นให้ผลดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 2.8

**ตารางที่** 2.8 ปริมาณไขมันที่สกัดได้จาก *Candida curvata*

| วิธีสกัด | ไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|
| เมทธานอล : เบนซีน (1:1) | 51.1 |
| เมทธานอล : เฮกเซน (1:1) | 36.1 |
| เอทธานอล : เบนซีน (1:1) | 31.2 |
| เอทธานอล : เฮกเซน (1:1) | 50.2 |
| คลอโรฟอร์ม : เมทธานอล (2:1) | 10.2 |
| ไฮโดรไลซ์ด้วย 2 N HCl | 43.7 |
| Alcoholic KOH 12% | 50.2 |

ที่มา : Moon and Hammond (1978)

Hammond *et al.* (1981) สรุปว่าการสกัดตามลำดับขั้นด้วยตัวทำละลายต่างๆ แล้วพบว่า เอทธานอล เฮกเซน และเบนซีน ในอัตราส่วน 10:10:10 มิลลิลิตรต่อกรัมเซลล์เปียก จะให้การสกัดไขมันใน *Candida curvata* ได้ดี และก็พบว่าการใช้วิธีการไฮโดรไลซีสด้วยโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ก็เป็นวิธีที่ใช้ได้เช่นกัน

Andlid *et al.* (1995) พบว่าในยีสต์ *Rhodotorula glutinis* สามารถใช้วิธีสกัดด้วย 2.14 M KOH ในเอทธานอลร้อยละ 12 โดยปริมาตร ต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเพื่อปรับพีเอชให้เท่ากับ 3 แล้วสกัดไขมันที่ได้ด้วยเฮกเซน

Certik *et al.* (1996) ทดลองสกัดไขมันจากรา *Mucor mucedo* CCF-1384 โดยวิธีสกัดสองขั้นตอนโดยใช้เอทธานอลร่วมกับเฮกเซนและโดยใช้โคโรฟอร์ม : เมทธานอล : บิวทานอล : น้ำ และ 0.1 M EDTA พบว่าทั้งสองวิธีนี้สามารถใช้ในการสกัดกรด GLA ได้

Park *et al.* (1999) ใช้วิธีการสกัดไขมันจากเซลล์รา *Mortierella alpina* โดยใช้ dichlorometane methanolic HCl และเฮกเซนร่วมกัน

Yamamura and Shimomura (1997) ใช้วิธีการสกัดไขมันจากเซลล์ของ *Schizochytrium* sp. SR 21 โดยใช้วิธีบดเซลล์ด้วย glass bead ที่ 10,000 รอบต่อนาที 5 นาที ในตัวทำละลายผสมของคลอโรฟอร์ม : เมทธานอล (1:2 โดยปริมาตร)

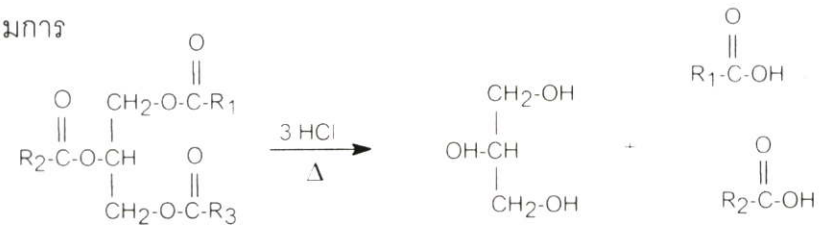
### 2.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน (fatty acid analysis)

#### 2.8.2.1 การสลายไตรกลีเซอไรด์

ในการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดไขมันต้องมีการทำลายพันธะเอสเทอร์ ซึ่งโดยทั่วไปก็จะทำได้ 3 วิธีคือ

**ก) ย่อยด้วยกรด** (acid hydrolysis)

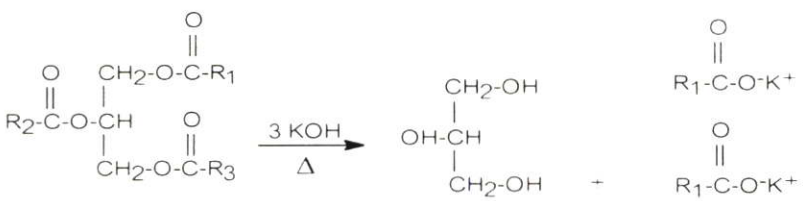
การสลายพันธะเอสเทอร์โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งจะได้กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ดังสมการ



ไตรกลีเซอไรด์ กลีเซอรอล กรดไขมัน

**ข) ย่อยด้วยด่าง** (alkaline hydrolysis)

ไตรกลีเซอไรด์เมื่อถูกย่อยโดยใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งจะได้กลีเซอรอลและสบู่ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า saponification



ไตรกลีเซอไรด์ กลีเซอรอล สบู่

สบู่ที่เกิดขึ้นนี้ละลายน้ำได้และสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไขมันโดยทำปฏิกิริยากับกรด กรดไขมันอิสระจะแยกตัวออกมา

สบู่ กรด กรดไขมัน โปตัสเซียมคลอไรด์

Jham *et al.* (1982) ได้ทดลองไฮโดรไลซ์น้ำมันถั่วเหลืองโดยใช้โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ สรุปว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือเมื่อใช้ 0.5 M KOH ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

**ง) ย่อยด้วยเอนไซม์** (enzyme hydrolysis)

ไตรกลีเซอไรด์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสหรือฟอสโฟไลเปสได้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน

การย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่ไม่รุนแรงไม่ต้องใช้ความร้อนสูง การเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และสภาวะในการย่อยที่ต่างกัน จะทำให้ได้ปริมาณกรดไขมันอิสระที่ต่างกัน

2.8.2.2 **การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน** (fatty acid analysis)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันทำได้โดย

**ก) การไตเตรท** (titration)

การไตเตรทเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

**ข) การเกิดสี** (colorimetric method)

จากการไฮโดรไลซ์ไขมันจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลกรดไขมันสามารถทำปฏิกิริยากับเกลือโลหะบางชนิดให้สบู่โลหะ (metallic soap) สบู่โลหะนี้สามารถดูดกลืนแสงในช่วง visible ได้ดี การดูดกลืนแสงนี้ไปเป็นตามกฎของเบียร์ (Beer's law) จึงสามารถหาปริมาณกรดไขมันได้

Lowry and Tinsley (1975) ได้ทดลองวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันด้วยวิธีการเกิดสี โดยการสกัดไขมันด้วยเบนซิน สารละลายของกรดไขมันที่ได้นี้นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายสีของ cupric acetate-pyridine ได้ cupric soap ซึ่งดูดกลืนแสงดีที่สุดที่ 715 นาโนเมตร วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันในปริมาณ 2.0-14.0 ไมโครโมล (0.5-4.0 มิลลิกรัม) ได้ดี โดยในการทดลองต้องควบคุมให้พีเอชของสารละลายสี cupric acetate-pyridine อยู่ในช่วง 6.0-6.2

Bains *et al.* (1964) ได้ทดลองวิธีปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์กรดไขมันด้วยวิธีการเกิดสีเพื่อวิเคราะห์กรดไขมันในน้ำมันถั่วลิสงโดยการสกัดไขมันด้วยเบนซินและทำปฏิกิริยากับสารละลายสีของ cupric acetate-pyridine โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 670 นาโนเมตร วิธีการนี้สามารถนำไปปรับใช้กับน้ำมันงาได้

Kwon and Rhee (1986) ได้ทดลองใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันโดยการเกิดสีเพื่อวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ย่อยไตรกลีเซอไรด์โดยใช้ cupric acetate-pyridine เป็นสารละลายสีแต่ใช้ไอโซออกเทน เป็นตัวทำละลายไขมันแทนการใช้เบนซิน พบว่า cupric soap ที่ได้ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นระหว่าง 710 และ 720 นาโนเมตร โดยพีเอชของ cupric acetate-pyridine อยู่ระหว่าง 5.8-6.4

วิธีวิเคราะห์กรดไขมันโดยการเกิดสีนั้นเป็นวิธีที่ดีและเหมาะสมสำหรับไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันซึ่งมีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากกว่า 10 เป็นองค์ประกอบ เช่น กรด

คาโปรอิค (caproic) คาไปรลิค (caprylic) คาปริค (capric) ลอริค (lauric) ไมริสติค (myristic) ปาลมิติค (palmitic) สเตียริค (stearic) และโอเลอิค (oleic)

การใช้ไพริดินเป็นตัวปรับพีเอชของสารละลายสี cupric acetate นี้จะช่วยทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะสบู่ได้ดีกว่าเมื่อไม่มีไพริดิน และนอกจากนี้ ไพริดินยังช่วยให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นได้อย่างเด่นชัดจึงสามารถใช้วิเคราะห์ได้ แม้มีปริมาณไขมันเพียง 2.0-14.0 ไมโครโมล

การใช้ไอโซออกเทน แทนเบนซีน จะช่วยทำให้พีเอชซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดกว้างขึ้น คือ จาก 6.0-6.2 เป็น 5.8-6.4 ไอโซออกเทนมีความหนาแน่นต่ำกว่าเบนซีน การแยกชั้นหลังจากสกัดไขมันจึงใช้เวลาสั้นกว่าเบนซิน และไอโซออกเทน มีค่า water immisibility สูงกว่าเบนซีน ทำให้มีน้ำละลายในชั้นของไอโซออกเทนน้อยกว่าในเบนซีน จึงทำให้การใช้ ไอโซออกเทน จะถูกรบกวนจากประจุที่มีอยู่ในน้ำน้อยกว่า

อัจฉราวรรณ ทองมี (2530) วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน โดยวิธีการเกิดสีในไขมันจากยีสต์ *Rhodotorula gracilis* ซึ่งปรับปรุงจากวิธีของ Kwon and Rhee (1986) พบว่าวิธีนี้สามารถใช้ได้ดี มีความว่องไวและแม่นยำใกล้เคียงกับการใช้วิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี

**ค) การทำปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์**

สามารถวัดหาปริมาณกรดไขมันอิสระด้วยเอนไซม์ได้ โดยจากการศึกษาของ Moreton (1989) พบว่าในยีสต์ *Apiotrichum curvatum* ATCC 20509 และ *Trichosporon cutaneum* เมื่อใช้ low-resolution nuclear magnetic resonance และ enzymatic glycerol estimation สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันได้

**ง) โครมาโตกราฟฟี**

วิธีการใช้โครมาโตกราฟฟีเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมมาก วิธีการคืออาศัยคุณสมบัติของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ที่จะสามารถจับกับเฟสคงที่ของโครมาโตกราฟฟีได้ต่างกัน แก๊สโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography) นิยมใช้กันมากสามารถใช้วิเคราะห์ได้ทั้งชนิดและปริมาณของกรดไขมัน มีความว่องไวและแม่นยำสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ใช้ปริมาณตัวอย่างต่ำ แต่ต้องมีเทคนิคและความชำนาญในการใช้เครื่อง

### 2.8.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของไขมัน

คุณสมบัติทางเคมีที่นิยมตรวจวิเคราะห์เพื่อบ่งชี้คุณภาพของไขมันได้แก่ ค่าไอโอดีน ค่าซาพอนนิฟิเคชัน ค่าของกรด ค่าเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น

ค่าไอโอดีนคือจำนวนกรัมของไอโอดีนที่ถูกดูดซับโดยไขมันหรือน้ำมันจำนวน 100 กรัม ค่าไอโอดีนเป็นตัวบ่งชี้ดีกรีของความไม่อิ่มตัว (degree of unsaturation) ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลของไขมัน ถ้ามีพันธะคู่มากไอโอดีนก็จะถูกดูดซับมาก

ค่าซาพอนนิฟิเคชันคือจำนวนน้ำหนักของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นมิลลิกรัมที่ใช้ในการทำให้กรดไขมันที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสอย่างสมบูรณ์ของไขมันหรือน้ำมันจำนวน 1 กรัม เป็นกลางพอดี ค่าซาพอนนิฟิเคชันเป็นตัวบ่งชี้หรือบอกให้ทราบขนาดหรือน้ำหนักของโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในโมเลกุลของไขมันหรือน้ำมัน ถ้ามีกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือขนาดของโมเลกุลเล็ก หรือมีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลน้อย จะใช้ด่างในการไฮโดรไลซีสมาก ทำให้ค่าซาพอนนิฟิเคชันสูง ในทางตรงกันข้ามถ้ามีกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือขนาดของโมเลกุลใหญ่หรือมีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลมาก จะใช้ด่างในการไฮโดรไลซีสน้อยทำให้ค่าซาพอนนิฟิเคชันต่ำ

ค่าของกรดคือจำนวนมิลลิกรัมของโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมันจำนวน 1 กรัม เป็นกลางพอดี ค่าของกรดเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณกรดไขมันอิสระแสดงว่าไตรกลีเซอไรด์ถูกทำลายให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระได้มากน้อยแค่ไหน

ค่าเปอร์ออกไซด์หมายถึงจำนวนมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ ที่ใชในการไตรเตรทไขมัน 1 กรัม เมื่อนำค่านี้มาคูณด้วย 2 จะได้ค่าเปอร์ออกไซด์ ซึ่งหมายถึงจำนวนมิลลิสมมูลของเปอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อไขมันหรือน้ำมัน 1 กิโลกรัม เป็นการวัดปริมาณเปอร์อออกไซด์ที่มีอยู่ในไขมันซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

**ตารางที่** 2.9 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันบางชนิด

| ชนิดของน้ำมัน | ค่าซาพอนนิฟิเคชั่น (มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์/ กรัมไขมัน) | ค่าไอโอดีน (Wijs) (กรัมไอโอดีน/100 กรัมไขมัน) | ค่าของกรด (มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์/ กรัมไขมัน) | ค่าเปอร์ออกไซด์(มิลลิสมมูล/ กิโลกรัม) |
|---|---|---|---|---|
| น้ำมันถั่วลิสง | 187-196 | 80-106 | 4 | 10 |
| น้ำมันเมล็ดฝ้าย | 189-198 | 99-119 | 0.6 | 10 |
| น้ำมันข้าวโพด | 187-195 | 103-128 | 4 (vergin oil) และ 0.6 (non vergin oil) | 10 |
| น้ำมันมะกอก (vergin) | 184-196 | 75-94 | 17 | 20 |
| น้ำมันมะกอก (refined) | 184-196 | 75-94 | 17 | 20 |
| น้ำมันเรพสีด | 168-181 | 94-120 | 4 (vergin) 0.6 (non vergin) | 10 |
| น้ำมันงา | 187-195 | 104-120 | 4 (vergin) 0.6 (non vergin) | 10 |
| น้ำมันถั่วเหลือง | 189-195 | 120-143 | 0.6 | 10 |
| น้ำมันเมล็ดทานตะวัน | 188-194 | 110-143 | 4 (vergin) 0.6 (non vergin) | 10 |
| ปาล์ม | 195-205 | 44-54 | 4-7 | 9-12 |

ที่มา : ลักขณา และนิธิยา (2531)

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินงานวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องชั่งละเอียด

3.1.2 เครื่องวัดพีเอช

3.1.3 ตู้บ่มอุณหภูมิต่ำ

3.1.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

3.1.5 ตู้อบลมร้อน

3.1.6 โถดูดความชื้น

3.1.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง

3.1.8 กล้องจุลทรรศน์

3.1.9 เครื่องเขย่าผสม

3.1.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.11 ตู้เย็น

3.1.12 เทอร์โมมิเตอร์

3.1.13 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน

3.1.14 เครื่องคราะห์โปรตีน

3.1.15 อุปกรณ์เครื่องแก้วต่าง ๆ

## 3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 3.3 วิธีการดำเนินงาน

### 3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินซึ่งคาดว่าเป็นแหล่งของยีสต์ไขมันสูงจากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ ดินที่เป็นบริเวณที่ใช้กองกากเศษวัตถุดิบพืชน้ำมันจากโรงงานสกัดน้ำมันในเขตจังหวัดกรุงเทพฯ นนทบุรี และสมุทรปราการ ประจวบฯ ชุมพร และระนอง มาทำการแยกเชื้อ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

### 3.3.2 การแยกเชื้อยีสต์และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อยีสต์ทำการแยกโดยวิธีดังนี้

#### 3.3.2.1 การแยกเชื้อโดยการขีดเพลท (streak culture method)

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ในอาหารเหลวแป้งมันสำปะหลัง (starch broth) ดังแสดงในภาคผนวก ก บรรจุฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ และปรับพีเอชเท่ากับ 3.5 เข้าเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน แตะตัวอย่างนี้มาขีดบนอาหารแข็งแป้งมันสำปะหลัง ในจานเพาะเชื้อที่ปรับพีเอช 3.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน

เมื่อสังเกตเห็นโคโลนียีสต์ให้ถ่ายโคโลนียีสต์เก็บไว้ในหลอดอาหารวุ้นเอียงแป้งมันสำปะหลัง (starch agar slant) โดยทำเครื่องหมายไว้ใต้จานเพาะเชื้อ จากนั้นให้เทสารละลายไอโอดีนราดลงในอาหารแข็งแป้งมันสำปะหลัง ในจานเพาะเชื้อนั้น สังเกตว่าโคโลนีไหนเกิดบริเวณใส (clear zone) แสดงว่าโคโลนีนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ จากนั้นก็นำโคโลนีของยีสต์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

#### 3.3.2.2 แยกเชื้อโดยวิธีเทเพลท (pour plate)

นำตัวอย่างดิน 11 กรัม มาทำสารละลายเชื้อ (suspension) โดยใช้สารละลายเปปโตนปราศจากเชื้อ 99 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เจือจางระดับต่าง ๆ ($10^{-1}$-$10^{-6}$ กรัมต่อมิลลิลิตร) ดูดตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ นี้ ใส่เพลท 1 มิลลิลิตร แล้วเทอาหารแข็งแป้งมันสำปะหลัง ลงไปโดยวิธีเทเพลทให้กระจายสม่ำเสมอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส 4-5 วัน สังเกตมียีสต์ขึ้นก็ทำการเก็บเช่นในข้อ 3.3.2.1

#### 3.3.2.3 การแยกเชื้อยีสต์ให้บริสุทธิ์

เชื้อยีสต์ที่เลือกมาได้ให้ทำการขีดบนอาหารแข็งแป้งมันสำปะหลัง ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 3.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน ทำการขีดเชื้อซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จนได้ลักษณะโคโลนีที่เหมือนกัน

#### 3.3.2.4 การคัดเลือกยีสต์ที่ย่อยแป้งได้

เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อยีสต์ที่แยกได้มีความสามารถในการย่อยแป้งจริง จึงต้องทำการคัดเลือกโดยวิธีแตะเชื้อบนอาหารแข็งแป้งมันสำปะหลัง (point inoculation) ดังแสดงในภาคผนวก ก นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งด้วยสารละลายไอโอดีน โดยเทสารละลายไอโอดีนให้ทั่วบริเวณผิวหน้าของอาหาร ทิ้งไว้ 2 นาที สังเกตบริเวณใส (clear zone) นำเชื้อที่ให้การทดสอบเป็นบวก ศึกษาในหัวข้อ 3.3.3 ต่อไป

3.3.3 **ศึกษาความสามารถในการผลิตไขมัน**

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.2.4 มาเลี้ยงในอาหารเหลวแป้งมันสำปะหลัง ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 8 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง เซลล์ที่ได้นำไปหาปริมาณเซลล์ (น้ำหนักแห้ง) และปริมาณไขมัน (ตามวิธีที่ดัดแปลงจากอัจฉราวรรณ ทองมี 2530) ดังแสดงในภาคผนวก ค

3.3.4 **ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมัน**

3.3.4.1 **ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไขมัน**

เชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมันสูงสุดที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.3.3 เลี้ยงโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3 แต่ทำการเก็บเกี่ยวและวิเคราะห์ไขมันทุก 2 วัน จนครบ 8 วันของการศึกษา เลือกระยะเวลาที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถผลิตไขมันได้สูงสุดนำไปศึกษาในหัวข้อที่ 3.3.4.2 ต่อไป

3.3.4.2 **ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนและอุณหภูมิ**

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ได้ในสูตรอาหารเหลวแป้งมันสำปะหลัง โดยแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 8:1 20:1 40:1 60:1 และ 80:1 ทำโดยให้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังและยีสต์สกัด (yeast extract) ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณคงที่ แต่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) ในสูตรอาหาร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 10 15 25 35 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4.1 จากการทดลองนี้จะได้ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมที่อุณหภูมิเหมาะสมที่จะให้การผลิตไขมันสูงสุดนำไปศึกษาในหัวข้อ 3.3.4.3 ต่อไป

3.3.4.3 **ศึกษาผลของการเติมวิตามิน โปตัสเซียมไซยาไนด์ และแคตอิออน**

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้โดยใช้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4.2 โดย

ก. เติมไบโอติน 0 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร

ข. เติมไทอะมิน 0 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร

ค. เติมโปตัสเซียมไซยาไนด์ 0 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร

ง. เติมซิงค์คลอไรด์ 0 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร

จ. เติมแมงกานีสคลอไรด์ 0 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองจะได้ว่ามีสารตัวใดตัวหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มปริมาณไขมันได้สูงสุดนำไปศึกษาต่อในหัวข้อ 3.3.4.4

3.3.4.4 **ศึกษาผลของการสกัดไขมันด้วยเฮกเซนโดยใช้**soxhlet apparatus

เลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้โดยใช้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4.3 นำเซลล์ยีสต์ที่เก็บเกี่ยวได้ไปอบแห้งไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง บดลดขนาดและนำไปสกัดไขมันด้วยเฮกเซนโดยใช้เครื่อง soxhlet apparatus คำนวนหาปริมาณไขมันในรูปไขมันสกัดหยาบ (crude oil)

3.3.5 **ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของไขมันที่ได้**

เลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้โดยใช้สภาวะเหมาะสมจากหัวข้อ 3.3.4.3 สกัดไขมันด้วยเฮกเซนโดยใช้เครื่อง soxhlet apparatus ตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.4.4 ไขมันที่ได้นำไปวิเคราะห์คุณสมบัติดังนี้

ก. ค่าซาพอนนิฟิเคชัน (saponification value)

ข. ค่าของกรด (acid value)

ค. ค่าไอโอดีน (iodine value)

ง. ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value)

จ. วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (สถาบันอาหาร แขวงบางยี่ขัน เขตบางพลัด กรุงเทพฯ)

3.3.6 **วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของกากเซลล์ที่เหลือจากการสกัดไขมัน**

นำกากเซลล์ที่เหลือจากการสกัดไขมันจากข้อ 3.5.4 มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธีเจล์ดาลใช้ชุดเครื่องสกัดวิเคราะห์โปรตีน ดังภาคผนวก ค

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและวิจารณ์

## 4.1 แหล่งดินตัวอย่าง

แหล่งดินตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อยีสต์ไขมันสูงที่ย่อยแป้งได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จะเห็นว่าดินซึ่งเป็นที่กองกากเศษวัตถุดิบที่ใช้สกัดน้ำมันซึ่งได้แก่ ดินที่เป็นที่กองกากเศษถั่วเหลือง กากเศษปาล์ม กากเศษรำข้าว กากเศษฝ้าย และกากเศษเมล็ดทานตะวัน เป็นแหล่งของยีสต์เป้าหมาย โดยดินบริเวณที่กองกากเศษถั่วเหลือง กากเศษปาล์ม จะให้ยีสต์ที่มีประสิทธิในการผลิตดีที่สุดแสดงว่ายีสต์เหล่านี้สามารถที่จะสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยเศษแป้งที่ยังหลงเหลืออยู่ในกากเศษวัตถุดิบแล้วนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการเจริญและการผลิตไขมันได้

## 4.2 การแยกเชื้อยีสต์และการทำให้บริสุทธิ์

จากการแยกเชื้อยีสต์จากดินตัวอย่างโดยวิธีขีดเพลท (streak plate) และ เทเพลท(pour plate) โดยการ enrichment ด้วยการใช้สูตรอาหารที่ใช้เฉพาะแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้อุณหภูมิต่ำที่ 15 องศาเซลเซียส และการปรับพีเอชให้เท่ากับ 3.5 เพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญแข่งของแบคทีเรีย พบว่าสามารถแยกเชื้อยีสต์เป้าหมายออกมาได้โดยจากตัวอย่างดินทั้งหมด 41 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อสามารถแยกได้เชื้อยีสต์ทั้งหมด 620 เชื้อ เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดโดยเทคนิคการแตะเชื้อ (point inoculum) บนผิวอาหารแข็งแป้งมันสำปะหลัง (starach agar) แล้วทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่ามีเชื้อยีสต์ที่ให้การทดสอบเป็นบวกกับสารละลายไอโอดีนทั้งหมดจำนวน 25 เชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

**ตารางที่** 4.1 แหล่งดินตัวอย่างและจำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้และจำนวนยีสต์ที่ย่อยแป้งได้

| ลำดับที่ | แหล่งตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่าง | จำนวนยีสต์ที่แยกได้ | ยีสต์ที่ย่อยแป้งได้ | รหัสเชื้อ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ดินกองเศษกากปาล์ม จ.ระนอง | 6 | 115 | 2 | BB-22,BB-295 |
| 2 | ดินกองเศษกากปาล์ม จ.ชุมพร | 5 | 100 | 2 | BB-11,BB-1 |
| 3 | ดินกองเศษกากปาล์ม จ.ประจวบฯ | 6 | 125 | 5 | PB-444,PB-666,PB-777,PB-888,PB-999 |
| 4 | ดินกองเศษวัตถุดิบ บ. อุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด จ.นนทบุรี | 5 | 85 | 2 | IB-2,IB-76 |
| 5 | ดินกองเศษวัตถุดิบ บ. มรกตอินดัสตรีย์จำกัด จ.สมุทรปราการ | 3 | 10 | - | - |
| 6 | ดินกองเศษวัตถุดิบ บ. น้ำมันบริโภคไทยจำกัด จ. สมุทรปราการ | 5 | 35 | 2 | OB-19,OB-30 |
| 7 | ดินกองเศษวัตถุดิบ บ.ธนกรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืชจำกัด จ สมุทรปราการ | 11 | 150 | 12 | TB-5,TB-7,TB-26,TC-1,TC-24,TD-1,TD-4,E-8,TE-38,TE-43,TF-38,TF-76 |
| | รวม | 41 | 620 | 25 | |

## 4.3 การศึกษาความสามารถในการผลิตไขมัน

จากการคัดเลือกได้ยีสต์ที่ย่อยแป้งได้จำนวน 25 เชื้อ เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง สภาพการเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 8 วัน พบว่ามีเชื้อยีสต์จำนวน 4 เชื้อที่ให้ปริมาณไขมันร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้งขึ้นไปโดยเชื้อที่ให้ปริมาณไขมันสูงสุดคือเชื้อในรหัส TD-4 ซึ่งให้ปริมาณปริมาณเซลล์ 10.83 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมัน 4.42 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 40.81 โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนเชื้อที่ให้ปริมาณไขมันรองลงมาคือเชื้อในรหัส BB-11 BB-1 และ BB-295 ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อยีสต์รหัส TD-4 เป็นเชื้อยีสต์ไขมันสูงเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

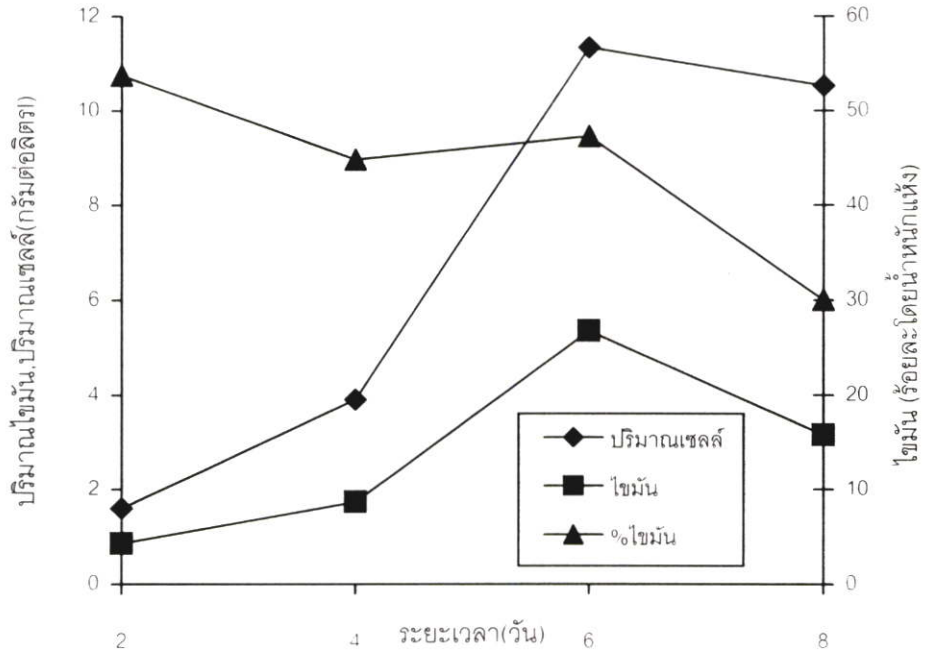
**ตารางที่** 4.2 ปริมาณไขมันและน้ำหนักแห้งของยีสต์ที่คัดเลือกได้

| ลำดับที่ | รหัสเชื้อ | น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) | ไขมัน (กรัมต่อลิตร) | ไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | TD-4 | 10.83 | 4.42 | 40.81 |
| 2 | BB-11 | 7.51 | 2.54 | 33.82 |
| 3 | BB-1 | 7.87 | 2.65 | 33.67 |
| 4 | BB-295 | 15.85 | 3.59 | 22.65 |
| 5 | PB-444 | 6.84 | 1.02 | 14.91 |
| 6 | BB-22 | 8.61 | 1.20 | 13.93 |
| 7 | OB-19 | 20.25 | 2.40 | 11.85 |
| 8 | PB-666 | 9.41 | 1.11 | 11.79 |
| 9 | IB-76 | 14.69 | 1.63 | 11.10 |
| 10 | TD-1 | 9.96 | 1.03 | 10.34 |
| 11 | PB-888 | 13.64 | 1.38 | 10.11 |
| 12 | TC-24 | 7.84 | 0.78 | 10.02 |
| 13 | IB-2 | 15.60 | 1.51 | 9.68 |
| 14 | TB-5 | 13.06 | 1.26 | 9.64 |
| 15 | TF-76 | 9.49 | 0.87 | 6.17 |
| 16 | TB-26 | 6.64 | 0.86 | 8.92 |
| 17 | TE-43 | 14.76 | 1.22 | 8.13 |
| 18 | OB-30 | 12.16 | 0.92 | 7.60 |
| 19 | PB-999 | 11.51 | 0.86 | 7.47 |
| 20 | TE-38 | 8.17 | 0.61 | 7.47 |
| 21 | TE-8 | 22.06 | 1.49 | 6.75 |
| 22 | TC-1 | 16.72 | 0.95 | 5.74 |
| 23 | TF-38 | 13.02 | 0.72 | 5.53 |
| 24 | PB-777 | 5.07 | 0.27 | 5.33 |
| 25 | TB-7 | 11.56 | 0.58 | 5.02 |

## 4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์รหัส TD-4

### 4.4.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิต

จากผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.3 คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ให้ไขมันสูงสุดมาศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสม โดยเลี้ยงในสูตรอาหารแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ก)ที่สภาวะการเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) พีเอชเริ่มต้น 5.5 เป็นเวลา 8 วัน โดยเก็บผลทุก 2 วัน ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.1



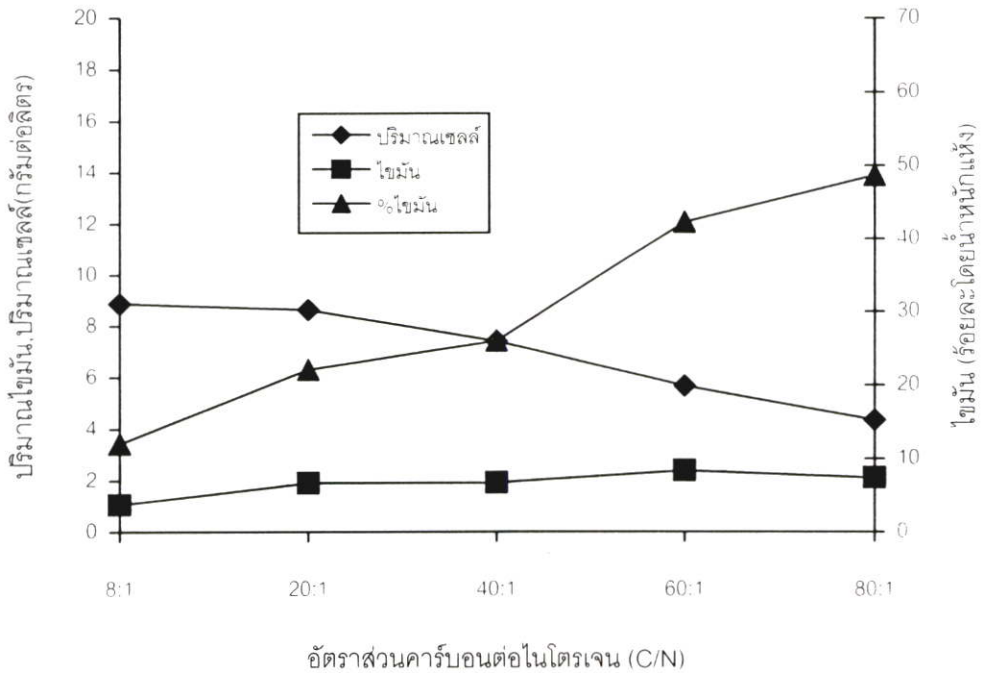

**รูปที่** 4.1 ปริมาณไขมันและน้ำหนักแห้งของยีสต์รหัส TD-4 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

จากรูปที่ 4.2 จะได้ว่าที่วันที่ 2 ของการหมักจะให้ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 53.75 โดยน้ำหนักแห้ง หรือเท่ากับ 0.86 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณเซลล์แห้งที่ได้มีค่าต่ำสุดคือเท่ากับ 1.60 กรัมต่อลิตร เมื่อยืดระยะเวลาออกไปอีกจะทำให้ปริมาณการผลิตไขมัน และปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 4 ของการหมักปริมาณเซลล์ที่ได้มีค่าเท่ากับ 3.89 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันเท่ากับ 1.74 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 44.78 โดยน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 6 ของการหมักปริมาณเซลล์ที่ได้มีค่าเท่ากับ 11.33 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันเท่ากับ 5.35 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 47.25 โดยน้ำหนักแห้ง แต่ในวันที่ 8 ของการหมักปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันลดลงคือปริมาณเซลล์ที่ได้มีค่าเท่ากับ 10.53 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันเท่ากับ 3.16 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 30.05 โดยน้ำหนักแห้ง

ที่ วันที่ 2 ถึงวันที่ 4 ของการหมัก ปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันที่ได้ยังมีค่าต่ำเนื่องจากเป็นช่วงเริ่มต้นที่ยีสต์เจริญ การสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยแป้งให้ได้เป็นน้ำตาลเพื่อที่จะนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์ยังมีน้อย ปริมาณน้ำตาลที่ได้ยังไม่เพียงพอ และเนื่องจากการผลิตไขมันของเซลล์จะเกิดขึ้นในช่วงการเจริญระยะเพิ่มการเจริญ (exponential phase) จนถึงช่วงสุดท้ายของการเจริญระยะคงที่ (late stationary phase) ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 10 วัน (Hammond and Glatz.1988) ดังนั้นในระยะแรกของการหมักซึ่งยังไม่เข้าสู่ช่วงการเพิ่มอัตราการเจริญจึงทำให้อัตราการผลิตไขมันต่ำ แต่จะเห็นว่าที่วันที่ 6 ของการหมักปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันจะเพิ่มขึ้นสูงสุด แต่ที่วันที่ 8 ของการหมัก ปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันมีค่าลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งคาร์บอนที่ได้จากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมีปริมาณลดลงจึงไม่เพียงพอที่เซลล์จะนำไปใช้เพื่อการดำรงชีพหรืออาจเนื่องจากในระหว่างการเจริญเซลล์มีการขับถ่ายของเสียออกมาหรือมีการสะสมของสารบางชนิด เช่น กรดจากการใช้น้ำตาลของยีสต์จึงเป็นสาเหตุของการยับยั้งการเจริญ เซลล์เริ่มตายในที่สุด ซึ่งจากการทดลองของอัจฉราวรรณ ทองมี (2530) พบว่ายีสต์ *Rhodotorula gracilis* จะเข้าสู่ระยะอัตราการเจริญระยะคงที่เมื่อ 28 ถึง 32 ชั่วโมงของการหมัก โดยในเชื้อเดียวกันนี้มนูเทพ กนกศิลป์ (2533) ได้ทดลองยืดเวลาการเลี้ยงออกไปเป็น 72 ชั่วโมง ก็พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์และปริมาณไขมัน แสดงว่าที่ 6 วัน เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไขมันของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้

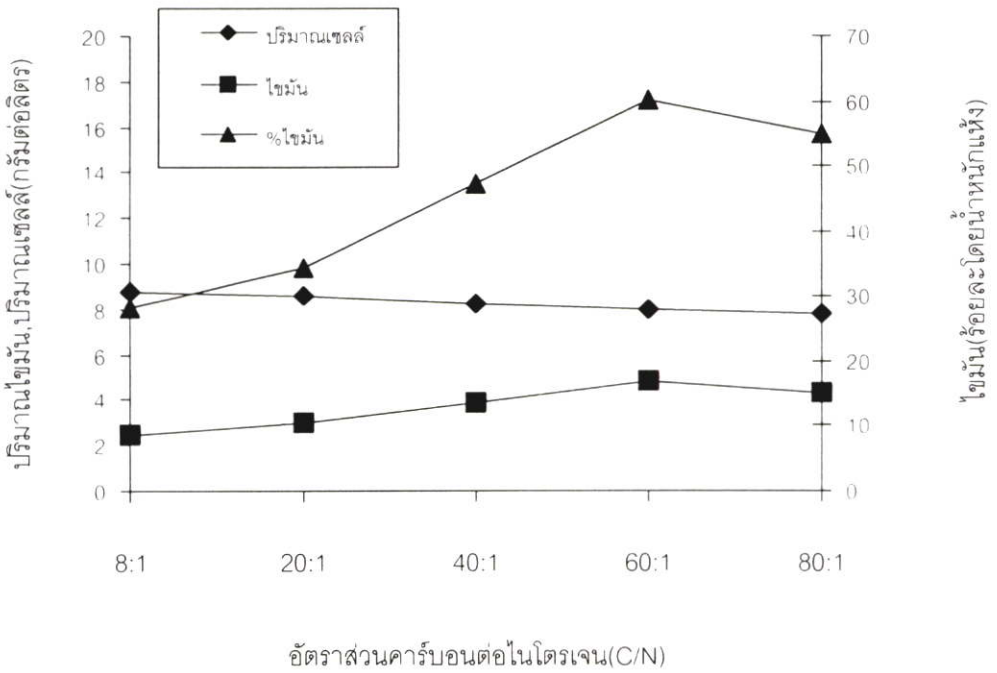
### 4.4.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมัน

จากผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.4.1 นำเชื้อยีสต์รหัส TD-4 มาศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนและอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยทำการแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสูตรอาหารให้เป็น 8:1 20:1 40:1 60:1 และ 80:1 ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 10 15 25 32 และ 35 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าที่ทุกอุณหภูมิและทุกอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ยีสต์สามารถเจริญและให้การผลิตไขมัน แต่ปริมาณไขมันที่ได้จะแตกต่างกันไป ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2-4.6



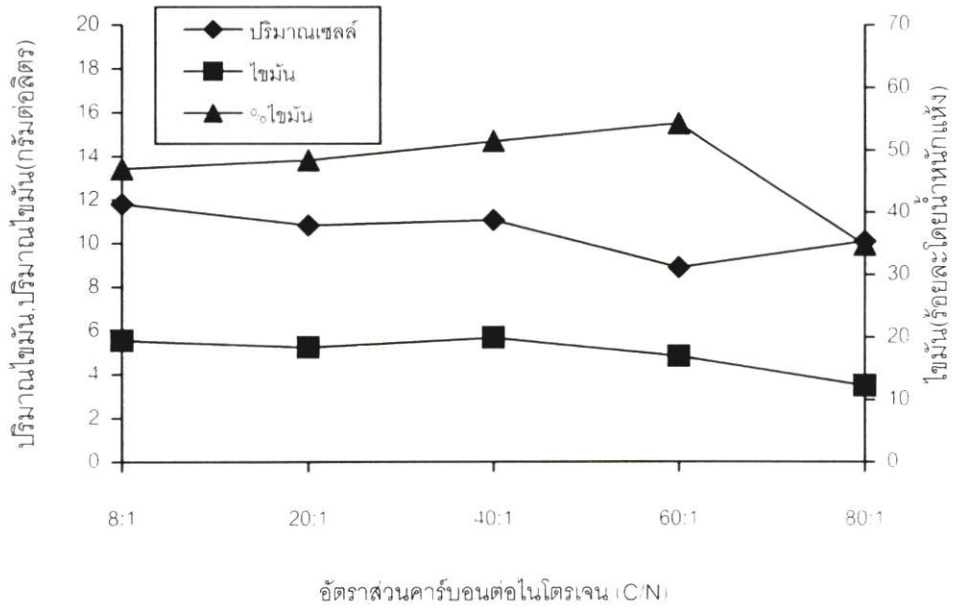

**รูปที่** 4.2 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.2 จะเห็นว่าที่ 10 องศาเซลเซียสจะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8:1 ปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 8.88 กรัมต่อลิตร แต่ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8:1 นี้จะให้ปริมาณไขมันต่ำสุดคือเท่ากับ 1.07 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 12.05 โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณเซลล์ต่ำสุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 80:1 ปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 4.36 กรัมต่อลิตร แต่ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 80:1 มีการผลิตไขมันได้สูงปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 2.12 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 48.62 โดยน้ำหนักแห้ง จึงเห็นว่าที่ 10 องศาเซลเซียส ยิ่งเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนจะทำให้ปริมาณการผลิตไขมันเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณเซลล์ที่ได้จะมีค่าลดลง โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:1 เป็นต้นไปจึงจะทำให้ได้ปริมาณไขมันร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้งขึ้นไป



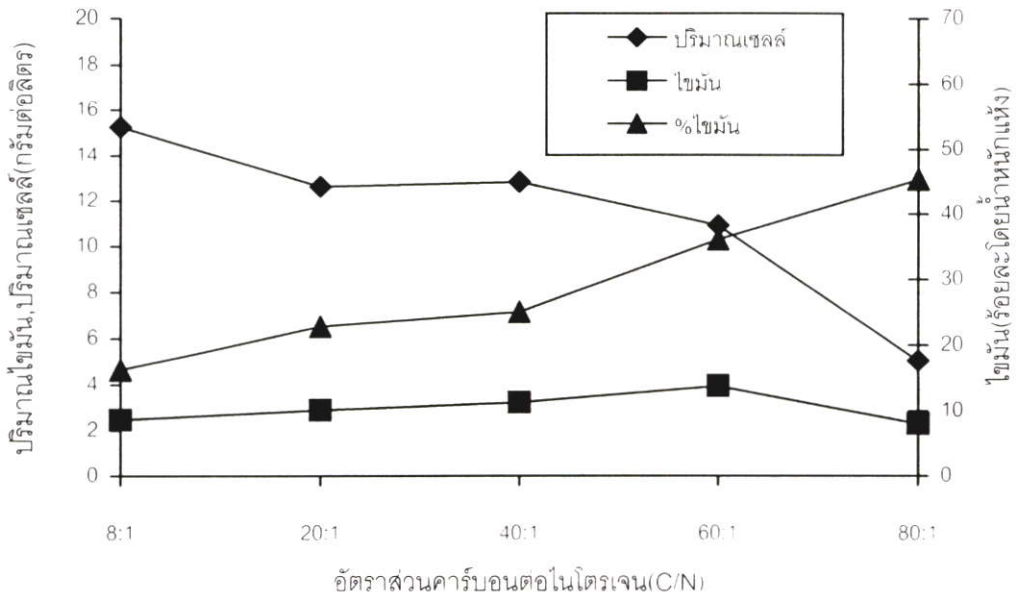

**รูปที่** 4.3 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.3 จะได้ว่าที่ 15 องศาเซลเซียส ปริมาณเซลล์สูงสุดเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8:1 โดยจะให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 8.78 กรัมต่อลิตร แต่ก็เช่นเดียวกับที่ 10 องศาเซลเซียส คือที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8:1 จะให้ปริมาณไขมันต่ำสุด ปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 2.47 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 28.12 โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณเซลล์ต่ำสุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 80:1 ปริมาณเซลล์เท่ากับ 7.85 กรัมต่อลิตร แต่ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 80:1 นี้ปริมาณไขมันที่ได้จะมีค่าสูง ปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 4.32 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 55.03 โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนปริมาณไขมันสูงสุดจะอยู่ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 โดยปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 4.80 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 60.30 โดยน้ำหนักแห้ง แต่ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเทากับ 60:1 นี้จะได้ปริมาณเซลล์ต่ำ ปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 7.97 กรัมต่อลิตร จะเห็นว่าที่ 15 องศาเซลเซียสนี้ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 จะให้ปริมาณไขมันมากกว่าจึงเลือกใช้ที่อัตราส่วนนี้ และจะเห็นว่าที่ 15 องศาเซลเซียสปริมาณการผลิตไขมันมีค่าสูงกว่าที่ 10 องศาเซลเซียส



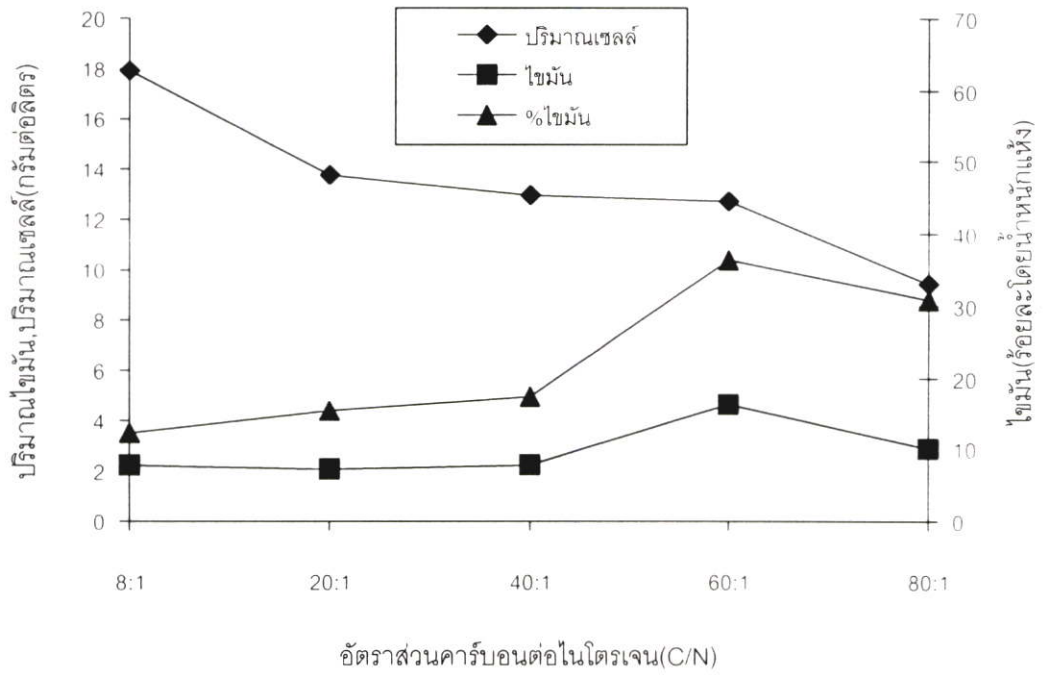

**รูปที่** 4.4 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณไขมันของยีสต์รหัส TD-4 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.4 จะได้ว่าที่ 25 องศาเซลเซียส ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8:1 จะให้มีปริมาณเซลล์สูงสุด ปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 11.81 กรัมต่อลิตร และปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 5.55 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 47.00 โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณเซลล์จะต่ำสุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 ปริมาณเซลล์เท่ากับ 8.90 กรัมต่อลิตร แต่ปรากฏว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 กลับมีปริมาณไขมันสูงสุด ปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 4.83 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 54.27 โดยน้ำหนักแห้ง จะเห็นว่าที่ 25 องศาเซลเซียสนี้ ปริมาณเซลล์ที่ได้จะมีค่าสูงกว่าที่ 15 และที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณไขมันที่ได้มีค่าต่ำกว่าจึงเห็นว่ายิ่งเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นก็กลับส่งเสริมให้มีการเจริญของเซลล์มากกว่าการผลิตไขมัน สำหรับที่ 25 องศาเซลเซียสนี้ถ้าจะทำการผลิตก็ควรเลือกใช้ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 เนื่องจากว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 80:1จะทำให้ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักแห้งลดลงมาอยู่ที่ร้อยละ 34.78 ที่ 25 องศาเซลเซียสนี้พบว่าถึงแม้จะเริ่มใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ (8:1) เซลล์ก็สามารถผลิตไขมันได้ และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเป็น 20:1 หรือ 40:1 ปริมาณไขมันที่ได้จะเพิ่มขึ้น คือได้ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 47.00 48.41 และ 51.50 ตามลำดับ แต่ปริมาณการผลิตไขมันก็มีค่าต่ำกว่าที่ 15 องศาเซลเซียส




**รูปที่** 4.5 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 ที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส)

จากรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิห้อง จะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8:1 ปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 15.26 กรัมต่อลิตร แต่ที่อัตราส่วน 8:1 จะได้ปริมาณไขมันต่ำสุด ปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 2.48 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 16.25 โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณเซลล์ต่ำสุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 80:1ปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 5.05 กรัมต่อลิตร แต่พบว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 80:1 นี้จะได้ปริมาณไขมันสูงสุดปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 2.29 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 45.34 โดยน้ำหนักแห้ง การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากว่าที่อัตราส่วน 80:1 นี้ มีปริมาณไนโตรเจนน้อยเกินไปจึงไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้เพิ่มปริมาณเซลล์ ปริมาณเซลล์ที่ได้จึงมีค่าน้อย ส่วนการผลิตไขมันก็เริ่มลดลงจากที่อัตราส่วน 60:1 แต่มีอัตราการลดลงที่น้อยกว่า เมื่อนำมาคิดเทียบเป็นไขมันโดยน้ำหนักแห้งจึงยังมีค่าสูง จึงเห็นว่าที่อุณหภูมิห้องนี้จะมีผลส่งเสริมการเจริญของเซลล์มากกว่าการสร้าง ไขมัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าที่อุณหภูมิห้องนี้เป็นอุณหภูมิไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ไขมัน




**รูปที่** 4.6 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.6 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสจะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8:1 ปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 17.95 กรัมต่อลิตร แต่ก็เช่นกันคือที่อัตราส่วนนี้การผลิตไขมันมีค่าต่ำ ปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 2.22 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 12.36 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 20:1 40:1 และ 60:1 จะทำให้ปริมาณเซลล์ลดลงเล็กน้อยและก็จะทำให้ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเช่นกัน ปริมาณเซลล์ที่ได้จะเท่ากับ 13.73 12.94 และ 12.69 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักแห้งที่ได้เท่ากับร้อยละ 15.44 17.31 และ 36.32 ตามลำดับ ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 80:1 นั้นพบว่าจะทำให้ปริมาณเซลล์ลดลงและปริมาณไขมันก็ลดลงเช่นกัน โดยปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 9.47 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 2.91 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 30.72 โดยน้ำหนักแห้ง

จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสนี้การสร้างไขมันจะเกิดสูงสุดเมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 แม้จะเพิ่มอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนขึ้นอีกเป็น 80:1 ก็ไม่มีผลช่วยเพิ่มอัตราการเจริญและการผลิตไขมันในขณะเดียวกันก็จะเห็นว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำกว่า 60:1 จะทำให้ได้ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักแห้งต่ำกว่าร้อยละ 20

จึงเห็นว่าที่อุณหภูมิสูงมีแนวโน้มที่จะเหมาะสมสำหรับการเจริญและเพิ่มปริมาณเซลล์มากกว่าการผลิตไขมันทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าที่อุณหภูมิสูงเป็นช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ไขมันก็เป็นได้

จากผลการทดลองจะเห็นว่ายีสต์รหัส TD-4 มีความสามารถในการผลิตไขมันที่อุณหภูมิและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่จำเพาะ แต่จะเห็นว่าในทุกอุณหภูมิจะมีแนวโน้มว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำจะเหมาะสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าการผลิตไขมัน ส่วนอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงจะเหมาะสำหรับการผลิตไขมันมากกว่าการเพิ่มปริมาณเซลล์ ซึ่งก็สอดคล้องกันกับ Gierhart (1984) ; Hammond and Glatz (1988) และ Ratlege and Evan (1989) ซึ่งสรุปว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำมักจำเป็นเพื่อใช้เพิ่มปริมาณเซลล์ แต่ในช่วงของการผลิตไขมันยีสต์ต้องการคาร์บอนสูงเพื่อนำไปเปลี่ยนเป็นไขมันจึงต้องการอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงโดยอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมควรมีค่ามากกว่า 10:1 และจะเหมาะสมยิ่งขึ้นถ้าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ประมาณมากกว่า 50:1 เช่นเดียวกับ อัจฉราวรรณ ทองมี (2530) ซึ่งพบว่าในยีสต์ *Rhodotorula gracilis* จะให้ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 34.20 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 75

จากการทดลองจึงได้ว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อยีสต์รหัส TD-4 นาน 6 วัน ที่ 15 องศาเซลเซียส อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 สามารถผลิตไขมันได้ดีจัดเป็นสภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตไขมันมากที่สุดจึงนำผลการทดลองที่ได้ไปศึกษาต่อไป

### 4.4.3 ศึกษาผลของการเติมวิตามิน โปตัสเซียมไซยาไนด์ และแคตอิออน

จากผลการทดลองคัดเลือกได้เชื้อที่ดีที่สุดคือเชื้อในรหัส TD-4 ทำการเลี้ยงในสูตรอาหารแป้งมันสำปะหลัง ปริมาตรบรรจุ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้น 5.5 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10 หมักนาน 6 วัน จากสภาวะเหมาะสมดังกล่าวนำมาศึกษาผลของการเติมวิตามิน โปตัสเซียมไซยาไนด์ และแคตอิออน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3

**ตารางที่** 4.3 ปริมาณไขมันและปริมาณเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 เมื่อเติมวิตามิน โปตัสเซียม ไซยาไนด์และแคตอิออน

| สารที่เติม | ปริมาณที่เติม (กรัมต่อลิตร) | น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร) | ไขมัน(ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|---|---|---|
| $MnCl_2$ | 1.0 | 8.03 | 5.03 | 62.64 |
| $MnCl_2$ | 0.5 | 8.38 | 5.51 | 65.75 |
| $Zn\ Cl_2$ | 1.0 | 8.45 | 5.53 | 65.44 |
| $Zn\ Cl_2$ | 0.5 | 8.36 | 4.59 | 54.90 |
| ไบโอติน | 1.0 | 8.05 | 4.58 | 56.89 |
| ไบโอติน | 0.5 | 8.15 | 5.26 | 64.53 |
| ไทอะมิน | 1.0 | 7.97 | 4.74 | 59.47 |
| ไทอะมิน | 0.5 | 8.06 | 5.53 | 68.61 |
| ชุดควบคุม | - | 7.96 | 4.80 | 60.30 |
| KCN | 1.0 | ไม่มีการเจริญ | - | - |
| KCN | 0.5 | ไม่มีการเจริญ | - | - |

จากผลการทดลองเมื่อเติม ไทอะมิน ไบโอติน โปตัสเซียมไซยาไนด์ และแคตอิออนซึ่งได้แก่ แมงกานีสคลอไรด์และซิงค์คลอไรด์ ในสูตรอาหารในอัตรา 1.0 และ 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติมแมงกานีสคลอไรด์ 1.0. กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยคือในชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสารใดได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 7.96 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณไขมันเท่ากับ 4.80 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 60.30 โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนในการเติมแมงกานีสคลอไรด์ 1.0 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 8.03 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเป็น 5.03 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 62.64 โดยน้ำหนักแห้ง แต่พบว่าถ้าเติมในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 8.38 กรัมต่อลิตร และปริมาณไขมันเพิ่มเป็น 5.51 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 65.75 โดยน้ำหนักแห้ง แสดงว่าการเติมแมงกานีสคลอไรด์ในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตรมีผลช่วยเพิ่มปริมาณไขมันได้แต่ที่ 1.0 กรัมต่อลิตรนี้กลับไปชลอการสร้างไขมัน

การเติมซิงค์คลอไรด์ 1.0 กรัมต่อลิตรจะทำให้ปริมาณเซลล์และปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นโดยจะทำให้ให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 8.45 กรัมต่อลิตรและปริมาณไขมันเพิ่มเป็น 5.53 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 65.44 โดยน้ำหนักแห้ง แต่การเติมซิงค์คลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตรกลับทำให้ปริมาณไขมันลดลงคือได้ปริมาณไขมันเท่ากับ 4.59 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 54.90 โดยน้ำหนักแห้งและได้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 8.36 กรัมต่อลิตร แต่จากการศึกษาของมนูเทพ กนก

ศิลป์ (2533) พบว่าการเติมซิงค์คลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ไม่ช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์และปริมาณไขมัน แสดงว่าเชื้อรหัส TD-4 น่าจะเป็นเชื้อคนละสายพันธุ์กับ *Rhodotorula gracilis*

การเติมไบโอติน 1.0 กรัมต่อลิตร ทำให้ปริมาณไขมันลดลงคือได้ปริมาณไขมันเท่ากับ 4.53 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 56.89 โดยน้ำหนักแห้ง แต่ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 8.05 กรัมต่อลิตร แต่พบว่าเมื่อเติมในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตรกลับช่วยทำให้ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเป็น 5.26 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 64.53 โดยน้ำหนักแห้ง แต่ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 8.15 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองจึงเห็นว่าถ้ามีการเสริมในสูตรอาหารด้วยไบโอตินในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร จะช่วยเพิ่มปริมาณไขมันได้ แต่ที่ 1.0 กรัมต่อลิตร กลับทำให้ปริมาณไขมันลดลงกว่าที่ไม่เติม

การเติมไทอะมิน 1.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณไขมันลดลงเล็กน้อยปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับ 4.74 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 59.47 โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกันนัก ปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 7.97 กรัมต่อลิตร แต่กลับพบว่าถ้าเติมในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตรจะช่วยให้ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเป็น 5.53 กรัมต่อลิตรหรือเท่ากับร้อยละ 68.61 โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยปริมาณเซลล์ที่ได้เท่ากับ 8.06 กรัมต่อลิตร แต่จากการศึกษาของมนูเทพ กนกศิลป์ (2533) กลับพบว่าการเติมไทอะมิน 0.1 กรัมต่อลิตร ไม่เพิ่มการเจริญและการผลิตไขมันแต่จะมีผลให้องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์เปลี่ยนแปลงคือจะทำให้ปริมาณกรดโอเลอิคลดลง จึงคาดว่าเชื้อรหัส TD-4 ที่คัดเลือกได้น่าจะเป็นคนละสายพันธุ์กับ *Rhodotorula gracilis*

การเติมโปตัสเซียมไซยาไนด์ 1.0 และ 0.5 กรัมต่อลิตรจะมีผลในการยับยั้งการเจริญและการผลิตไขมันของยีสต์รหัส TD-4 ทั้งนี้อาจเนื่องจากอนุมูลของไซยาไนด์มีความเป็นพิษจึงมีผลยับยั้งการเจริญ แต่จากการศึกษาของมนูเทพ กนกศิลป์ (2533) กลับพบว่าการเติมโปตัสเซียมไซยาไนด์ 1.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญและการผลิตไขมันของยีสต์ *Rhodotorula gracilis* ดีกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมโปตัสเซียมไซยาไนด์ ดังนั้นเชื้อรหัส TD-4 จึงเป็นคนละสายพันธุ์กับ *Rhodotorula gracilis*

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเติมโปตัสเซียมไซยาไนด์ จะมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตไขมันอย่างเห็นได้ชัด ส่วนการเติมแมงกานีสคลอไรด์ ซิงค์คลอไรด์ ไบโอตินและไทอะมินจะมีผลช่วยเพิ่มปริมาณไขมันแต่ต้องเติมในอัตราที่เหมาะสมคือ แมงกานีสคลอไรด์ ไบโอตินและไทอะมินเติมในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร ส่วนซิงค์คลอไรด์เติมในอัตรา 1.0 กรัมต่อลิตร การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากว่าอนุมูลต่าง ๆ ที่เติมลงไปดังกล่าวอาจไปมีผลช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ไขมันก็เป็นได้ ที่การเติมไทอะมิน 0.5 กรัมต่อลิตร จัดเป็นสภาวะที่ดีที่สุดที่จะทำให้การผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อคิดเป็นประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไขมันจะได้เท่ากับ 18.42 กรัมไขมันต่อ100 กรัมของแป้งที่ถูกใช้ไป ซึ่งก็พบว่าจากการศึกษาของ Yoon and Rhee

(1983) จะได้ว่ายีสต์ *Rhodotorula glutinis* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณเซลล์ 6.7 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณไขมันร้อยละ 57.2 และได้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไขมันเท่ากับ 16.4 กรัมไขมันต่อ 100 กรัมกลูโคสที่ถูกใช้ไปจึงนำผลการทดลองที่ได้ไปศึกษาต่อไป

4.4.4 **ศึกษาผลของการสกัดไขมันด้วยเฮกเซนโดยใช้** soxhlet apparatus

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองซึ่งได้แก่การเลี้ยงในสูตรอาหารแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 เติมไทอะมินในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน มาทำการผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูงรหัส TD-4 ไขมันที่สกัดได้มีลักษณะคือเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง สีเหลืองอ่อน จากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้ soxhlet apparatus ได้ปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 31.02 โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณไขมันที่ได้นี้มีค่าน้อยกว่าปริมาณไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี colorimetric ที่ใช้ในการทดลองในช่วงแรก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าวิธีการสกัดที่ใช้มีประสิทธิภาพในการสกัดแตกต่างกัน สำหรับวิธีวิเคราะห์โดยวิธี colorimetric นั้นเป็นการสกัดให้กรดไขมันออกมาทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอิออนของโลหะได้เป็นสบู่โลหะแล้ววัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดไขมันมาตรฐาน แต่สำหรับวิธีการสกัดด้วยเฮกเซนโดยใช้ soxhlet apparatus นี้เป็นการสกัดไขมันทั้งหมดในลักษณะการสกัดหยาบ (crude oil) แล้วชั่งน้ำหนักหาปริมาณไขมันทั้งหมดที่ได้ ซึ่งในกระบวนการสกัดด้วยเฮกเซนโดยตรงนี้ไม่มีขั้นตอนการไฮโดรไลส์เซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายด่าง (โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์) เหมือนในการวิเคราะห์โดยวิธี colorimetric ไขมันที่สกัดออกมาได้จะมีไขมันหลายชนิดปนกันอยู่ แต่ในวิธี colorimetric กรดไขมันจะถูกสกัดออกจากโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์แล้วถูกทำปฏิกิริยาการเกิดสีโดยตรง วิธีวัดปฏิกิริยาทางเคมีโดยตรงจึงน่าจะมีความไวกว่าวิธีการชั่งน้ำหนักแต่ก็ไม่ชัดเจนว่าจะมีความแม่นยำกว่าวิธีการใช้ soxhlet apparatus แต่เนื่องจากมีความไวกว่าอีกทั้งยังสะดวกและง่ายจึงได้เลือกใช้โดยจากการทดลองของ Lowry and Tinsley (1975); Brains et al. (1964);Kwon avd Rhee(1986);อัจฉราวรรณ ทองมี (2530) และมนูเทพ กนกศิลป์ (2533) ก็สรุปว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธีการเกิดสีนี้มีความไวสูงและใช้ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามก็จะเห็นว่าวิธีการสกัดไขมันโดยใช้ soxhlet apparatus โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กับในพืชน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมก็สามารถนำมาใช้กันยีสต์ไขจมันสูงได้เช่นกัน

## 4.5 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของไขมัน

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองซึ่งได้แก่การเลี้ยงในสูตรอาหารแป้งมันสำปะหลังซึ่งมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60:1 เติมไทอะมินในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน มาทำการผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูงรหัส TD-4 โดยใช้วิธีการสกัดด้วยเฮกเซนโดยใช้ soxhlet apparatus ไขมันที่สกัดได้มีลักษณะคือเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง สีเหลืองอ่อน เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี พบว่าไขมันที่ได้มีค่าซาพอนนิฟิเคชัน (saponification value) เท่ากับ 189 มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมน้ำมัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับไขมันจากพืช เช่นในน้ำมันรำข้าวเท่ากับ 181-189 น้ำมันงาเท่ากับ 188-195 ในน้ำมันเมล็ดทานตะวันเท่ากับ 188-194 น้ำมันถั่วลิสงเท่ากับ 188-195 และในน้ำมันมะพร้าวเท่ากับ 250-264 (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2529) ค่าซาพอนนิฟิเคชันนี้ใช้เป็นตัวบ่งชี้ขนาดโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุลของไขมันหรือ น้ำมันนั้น ไขมันหรือน้ำมันที่มีค่าซาพอนนิฟิเคชันสูงแสดงว่ากรดไขมันในที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือขนาดโมเลกุลเล็ก จึงมีจำนวนโมเลกุลของ ไตรกลีเซอไรด์ต่อหน่วยน้ำหนักเป็นจำนวนมาก จึงต้องใช้ด่างเป็นจำนวนมากในการไฮโดรไลซีส จากค่าซาพอนนิฟิเคชันจะเห็นว่าไขมันที่ได้มีลักษณะคล้ายกับพืชน้ำมันคือ ซึ่งมีค่าซาพอนนิฟิเคชันประมาณ 184-205

จากการวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์พบว่าไขมันที่ได้มีค่าเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 7 มิลลิสมมูลต่อกิโลกรัม ค่าเปอร์ออกไซด์จะบ่งชี้ถึงปริมาณสารเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในไขมันหรือน้ำมันนั้น ถ้าค่าเปอร์ออกไซด์สูงแสดงว่าเกิดการออกซิเดชันมาก จึงทำให้ได้สารประกอบเปอร์ออกไซด์สูง ซึ่งปกติแล้วน้ำมันหรือไขมันบริโภคธรรมชาติควรมีค่าเปอร์ออกไซด์ไม่เกิน 10

จากการวิเคราะห์ค่าของกรดพบว่าไขมันที่ได้มีค่าของกรดเท่ากับ 6 มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน ค่าของกรดใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมันมีกรดไขมันอิสระอยู่มากน้อยเพียงใด ถ้าค่าของกรดสูงแแสดงว่าไตรกลีเซอไรด์อาจถูกทำลายไปมากจึงได้เป็นกรดไขมันอิสระมาก หรือถ้าในน้ำมันใหม่ถ้าค่าของกรดสูงแสดงว่าในองค์ประกอบของไขมันหรือน้ำมันนั้นๆ มีกรดไขมันอิสระเป็นองค์ประกอบอยู่สูง เช่นในน้ำมันรำข้าวพบว่ามีกรดไขมันอิสระสูงมากเพราะรำข้าวมีเอนไซม์ไลเปสสูงจึงมีการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์จนได้เป็นกรดไขมันอิสระออกมามาก เมื่อนำรำข้าวใหม่ๆมาสกัดน้ำมันออก น้ำมันที่ได้จะมีกรดไขมันอิสระประมาณสูง (ร้อยละ 4-6) จึงต้องรีบทำให้บริสุทธิ์ทันทีหลังการสกัด แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันรำข้าวก็ยังมีความคงตัวต่อการออกซิเดชันเพราะมีวิตามินอีเป็นสารต้านการออกซิเดชัน (antioxdant) ตามธรรมชาติสูง จึงเห็นว่ายีสต์รหัส TD-4 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยไตรกลีเซอไรด์จนได้เป็นกรดไขมันอิสระในปริมาณสูง ดังนั้นหลังการสกัดจึงควรรีบนำไปทำบริสุทธิ์ทันที

เมื่อนำไขมันที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าไอโอดีนพบว่ามีค่าเท่ากับ 52.3 กรัมต่อ 100 กรัมไขมัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าไอโอดีนของน้ำมันปาล์มซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 20-60 (นิธิยา รัตนาปนนท์. 2529) ค่าไอโอดีนจะใช้บ่งชี้ว่าไขมันหรือน้ำมันนั้นมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นส่วนประกอบอยู่ในโมเลกุลมากน้อยเพียงใด ถ้าค่าไอโอดีนสูงแสดงว่ามีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นส่วนประกอบอยู่สูง ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการเหม็นหืนชนิดที่มีออกซิเจนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (oxidative rancidity) ได้ง่าย และค่าไอโอดีนยังเป็นตัวบ่งชี้คุณค่าทางโภชนาการของไขมันหรือน้ำมันนั้นๆ ด้วย โดยถ้ามีค่าไอโอดีนสูงจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากจะมีปริมาณกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวอยู่สูงนั่งเอง ซึ่งกรดไขมันจำเป็นนี้ร่างกายมนุษย์จำเป็นที่จะต้องได้รับจากการบริโภคเข้าไป เนื่องจากในร่างกายมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็น ($\Delta$9 desaturase) โดยตรง จะเห็นว่าค่าไอโอดีนของไขมันที่ได้มีค่าไม่สูงแสดงว่าไขมันที่ได้มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นส่วนประกอบอยู่น้อยนั่นคือจะมีกรดไขมันจำเป็นเป็นองค์ประกอบอยู่น้อยนั่นเอง แต่จะมีข้อดีคือไขมันที่ได้จะเกิดการหืนชนิดที่มีออกซิเจนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (oxidative rancidity) ได้ยากกว่า

คุณสมบัติทางเคมีของไขมันจากยีสต์รหัส TD-4 ดังแสดงในตารางที่ 4.4

**ตารางที่ 4.4** คุณสมบัติทางเคมีของไขมันจากยีสต์รหัส TD-4

| คุณสมบัติทางเคมี | ค่าที่ได้ | หน่วย |
|---|---|---|
| ค่าไอโอดีน (iodine value) (Wijs) | 52.3 | กรัมต่อ100กรัมไขมัน |
| ค่าซาพอนนิฟิเคชัน (saponification value) | 189 | มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมน้ำมัน |
| ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value) | 7 | มิลลิสมมูลต่อกิโลกรัม |
| ค่าของกด (acid value) | 6 | มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมน้ำมัน |

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟฟีพบว่าองค์ประกอบหลักเป็นกรดโอเลอิค (C18:1) กรดปาลมิติค (C16:0) กรดสเตียริค (C18:0) กรดลิโนเลอิค (C18:2) ในปริมาณร้อยละ 34.35 20.6 17.76 และ 17.00 ตามลำดับ นอกจากนั้นก็จะเป็นองค์ประกอบอื่นๆ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันจากยีสต์ไขมันสูงที่ได้จะเห็นว่าปริมาณและชนิดขององค์ประกอบของกรดไขมันที่ได้สอดคล้องกับ Ratledge and Tan (1990) ซึ่งกล่าวว่าองค์ประกอบหลักของไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากยีสต์ไขมันสูงจะประกอบไปด้วยกรดโอเลอิคกรดปาลมิติค

กรดสเตียริค และกรดลิโนเลอิค ซึ่งคล้ายคลึงกับองค์ประกอบที่พบในไขมันจากพืชน้ำมันแต่การเรียงตัวในตำแหน่งของไตรกลีเซอไรด์อาจแตกต่างกันไปโดยชนิดของกรดไขมันที่ได้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับที่พบในน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วลิสง และในเนยโกโก้ ไขมันที่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม Oleic-linoleic group ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญส่วนมากได้มาจากพืชน้ำมันทั้งหมด ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอิ่มตัวน้อยคือประมาณร้อยละ 20 ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวคือ กรดโอเลอิค และลิโนเลอิค จึงเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ใช้เป็นน้ำมันสำหรับปรุงอาหารดีที่สุด จากผลการทดลองจะเห็นว่าไขมันที่ได้จากยีสต์ไขมันสูงรหัส TD-4 สามารถนำไปใช้แทนไขมันบริโภคที่ได้จากพืชน้ำมันได้เนื่องจากมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกันโดยถ้าสามารถพัฒนาระบบถังหมักที่มีการเติมออกซิเจนให้มีกำลังการผลิตสูงๆ ผลิตได้คราวละมากๆ ได้ก็นับว่าเป็นข้อได้เปรียบที่จะทำการผลิตไขมันจากยีสต์ไขมันสูงแข่งขันกับการผลิตไขมันจากพืชน้ำมัน เนื่องจากในการผลิตจากยีสต์จะใช้ระยะเวลาสั้นเพียง 6 วันเท่านั้น แต่ในพืชน้ำมันต้องใช้เวลาในการเพาะปลูกและดูแลรักษากว่าจะได้ผลผลิตต้องใช้เวลานาน ให้เสียเวลาและต้นทุนสูงเนื่องจากพืชน้ำมันบางประเภท เช่น ถั่วเหลือง ประเทศไทยยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ การผลิตจากยีสต์จึงน่าจะได้เปรียบกว่า จากการทดลองสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีราคาถูกมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้จึงเห็นว่านอกจากจะช่วยลดต้นทุนแล้วยังเป็นแนวทางในการช่วยเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรที่มีมากและราคาถูกได้อีกทางหนึ่ง และนอกจากนี้ไขมันที่ได้อาจนำไปใช้เป็นแหล่งของกรดลิโนเลอิคซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไดโฮโมแกมม่าลิโนเลนิค กรดอะราชิโดนิค และกรดแอดเรนิค แต่จะเห็นว่าไขมันที่ได้มีปริมาณกรดลิโนเลนิคต่ำคือมีเพียงร้อยละ 0.16 เท่านั้น ไขมันที่ได้จึงไม่ใช่แหล่งที่ดีของกรดลิโนเลนิคซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรด EPA และกรด DHA ด้วยเหตุนี้ไขมันที่ได้จึงยังไม่ถือเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม (high value added product) แต่อาจนำความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมมาปรับปรุงหาสายพันธุ์ที่มีความสามารถได้ต่อไป และนอกจากนี้ไขมันที่ได้อาจนำไปปรับปรุงเป็นไขมันที่ใช้ทดแทนเนยโกโก้ซึ่งมีราคาแพงได้ แต่อาจมีปัญหาว่าในไขมันที่สกัดได้ยังมีองค์ประกอบของกรดสเตียริคน้อยเกินไปคือมีเพียงร้อยละ 17.76 ซึ่งในไตรกลีเซอไรด์ของเนยโกโก้ต้องมีองค์ประกอบของกรดสเตียริคประมาณร้อยละ 32-37 กรดโอเลอิคร้อยละ 30-37 และกรดปาลมิติคร้อยละ 23-30 แต่ได้มีการศึกษาแล้วพบว่าการใช้ sterculic acid และ malvalic acid เติมลงในสูตรอาหารจะช่วยปรับปรุงปริมาณกรดสเตียริคในไขมันจากยีสต์ให้เพิ่มสูงขึ้นได้เนื่องจากว่าสารเหล่านี้จะทำหน้าที่ในการยับยั้งเอนไซม์ sterate $\Delta 9$ desaturase ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยนกรดสเตียริคเป็นกรดโอเลอิค จึงอาจเป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำไปใช้ปรับปรุงไขมันจากยีสต์รหัส TD-4 หรืออาจพัฒนาปรับปรุงเพื่อใช้เป็นน้ำมันดีเซล โดยใช้เทคโนโลยีเอนไซม์เพื่อไฮโดรไลส์โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันที่จะนำไปทำเอสเทอริฟิเคชันได้เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนใช้เป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้เครื่องยนต์ นอกจากนี้ยังอาจนำไขมันที่ได้

ปรับปรุงพัฒนาเป็นไขมันดัดแปลง (lipid structured) ได้เป็นไขมันชนิดใหม่ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันตามต้องการได้ องค์ประกอบของกรดไขมันที่ได้จากยีสต์รหัส TD-4 ดังแสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่** 4.5 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากยีสต์รหัส TD-4

| กรดไขมัน | ร้อยละโดยน้ำหนัก |
|---|---|
| Mysristic acid (C14:0) | 0.63 |
| Palmitic acid (C16:0) | 20.61 |
| Stearic acid (C18:0) | 17.76 |
| Oleic acid (C18:1) | 34.35 |
| Linoleic acid (C18:2) | 17.00 |
| Linolenic acid (C18:3) | 0.16 |
| Arachidic acid (C20:0) | 3.73 |
| Eicosenoic acid (C20:1) | 0.55 |
| Benhenic acid (C22:0) | 2.50 |
| Erucic acid (C22:1) | 0.00 |
| Lignoceric acid (C24:0) | 1.13 |

สำหรับลักษณะของหยดไขมันภายในเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 ที่คัดเลือกได้จะมีลักษณะเป็นหยดไขมันเล็กๆ 2 หยดอยู่บริเวณหัวและท้ายเซลล์ซึ่งสอดคล้องกันกับ Evans and Ratledge (1983) ลักษณะของหยดไขมันภายในเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 ดังแสดงในรูปที่ 4.7

**รูปที่** 4.7 แสดงรูปหยดไขมันภายในเซลล์ของยีสต์รหัส TD-4 เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารแป้งมันสำปะหลังอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 60:1 โดยเติมไทอะมิน 0.5 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน กำลังขยาย × 1000

จากรูปแสดงให้เห็นว่าลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ผลิตไขมันได้จะมีลักษณะของหยดไขมันภายในเซลล์ที่ขนาดใหญ่อยู่บริเวณหัวและท้ายเซลล์ สอดคล้องกับการทดลองของ Evans and Ratledge (1984) ซึ่งพบว่าเชื้อยีสต์ *Rhodosporidium thoruloides* CBS14 สามารถผลิตหยดไขมันบริเวณหัวและท้ายของเซลล์เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ กลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณไขมันโดยน้ำหนักแห้งเท่ากับร้อยละ 52

## 4.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของกากเซลล์ที่เหลือจากการสกัดไขมัน

กากที่เหลือจากการสกัดไขมันเมื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาล์ได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 15.27 โดยน้ำหนักแห้งของกากที่สกัดไขมันแล้ว จึงเห็นว่าน่าจะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้แต่เมื่อเทียบกับกากถั่วเหลืองซึ่งให้โปรตีนสูงถึงร้อยละ 30 หรือในปลาป่นซึ่งมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 40-50 กากเซลล์ที่ได้จากยีสต์ไขมันสูงรหัส TD-4 ก็ยังมีปริมาณโปรตีนที่ต่ำกว่า

## 4.7 การวิเคราะห์ผลิตผล (yield)

จากการทดลองได้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไขมันเท่ากับ 18.42 กรัมไขมันต่อ 100 กรัมของแป้งที่ถูกใช้ไป ถ้าใช้แป้ง 1000 กรัม จะได้ไขมัน 184.2 กรัม ปริมาณไขมันที่ได้ยังมีค่าต่ำ จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงแนวทางในการที่จะเพิ่มผลผลิตต่อไป

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลอง

1. จากการคัดแยกเชื้อ แยกได้เชื้อยีสต์ทั้งหมด 620 เชื้อ เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมันสูงสุดคือเชื้อรหัส TD-4

2.สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันคือระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตที่ 6 วัน อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 60:ปริมาณไขมันที่ได้เท่ากับร้อยละ 60.30 โดยน้ำหนักแห้ง

3. การเติมไทอะมินในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นสูงสุดได้เท่ากับร้อยละ 68.61 โดยน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือการเติมแมงกานีสคลอไรด์ในอัตรา 0.5 กรัมต่อลิตร ได้ไขมันเพิ่มเป็นร้อยละ 65.75 การเติมซิงคลอไรด์ในอัตรา 1.0 กรัมต่อลิตร ได้ไขมันเพิ่มเป็นร้อยละ 65.44 การเติมไบโอติน 0.5 กรัมต่อลิตร ได้ไขมันเพิ่มเป็นร้อยละ 64.53 และการเติมแมงกานีสคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร ได้ไขมันเพิ่มเป็นร้อยละ 62.64 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

4. การเติมโปตัสเซียมไซยาไนด์จะยับยั้งการเจริญและการผลิตไขมัน

5. ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไขมันได้เท่ากับ 18.42 กรัมไขมันต่อแป้งที่ถูกใช้ไป 100 กรัม

6. ไขมันที่ได้มีค่าไอโอดีนเท่ากับ 52.3 กรัมต่อ100 กรัมไขมัน ค่าซาพอนนิฟิเคชันเท่ากับ 189 มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน ค่าเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 7 มิลิสมมูลต่อกิโลกรัม และค่าของเท่ากับ 6 มิลลิกรัมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน

7.องค์ประกอบหลักของกรดไขมันที่ได้ประกอบไปด้วยกรดปาลมิติคร้อยละ 20.61 กรดสเตียริคร้อยละ 17.76 กรดโอเลอิคร้อยละ 34.35 และกรดลิโนเลอิคร้อยละ 17.00

8. ปริมาณโปรตีนในกากเซลล์ที่เหลือจากการสกัดไขมันมีค่าเท่ากับร้อยละ 15.72 โดยน้ำหนักแห้ง จึงสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนอาหารสัตว์ได้

# ข้อเสนอแนะ

1.สามารถใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี colorimetric กับยีสต์รหัส TD-4 ได้

2. ควรมีการศึกษาการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอื่นๆ เปรียบเทียบกับเฮกเซน

# บรรณานุกรม


ปาน พิมพา. 2522. ชีวเคมีพื้นฐาน : **เมตะโบลิซึมของลิปิด**. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2529. **วิทยาศาสตร์การอาหารของน้ำมันและไขมัน**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มนูเทพ กนกศิลป์. 2533. "ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตไขมันของยีสต์ *Rhotorula gracilis*" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2531. **หลักการวิเคราะห์อาหาร**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อัจฉราวรรณ ทองมี. 2530. "การสกัดกรดไขมันจากยีสต์โรโดโทรูลา กราซิลิส" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

Akimoto, M., Iishi, T., Yamagaki, K., Ohtaguchi, K., Koide, K. and Yazawa, K. 1990."Production of eicosapentaenoic acid by a bacterium isolated from mackerel intestines." **JOACS**. 67 (12) : 911-915.

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

Albrecht, A., Rau, U. and Wagner, F. 1996. "Initial streps of sophorose lipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 growth on glucose." **Appl. Microbiol Biotechnol**. 46 : 67-73.

Andlid, T., Larsson, C. and Marison, I. 1995. "Entalpy content as a function of lipid accumution in *Rhodotorula glutinis*." **Appl. Microbiol Biotechnol**. 42 : 818-825.

Association Official Analytical Chemists. (AOAC). 1995. Official Method of Analysis of AOAC International 16$^{th}$ edition. Washington DC.

Bains, G.S., Rao, U. and Bhatia, D.S. 1964. "A colorimetric procedure for the estimation of fat acidity in peanuts and peanut meals." **JAOCS**. 41 : 831-832.

Bati, N., Hammond, B.G. and Glatz, B.A. 1984. "Biomodification of fats and oils : trials with *Candida lipolytica*." **JAOCS**. 61 (11) : 1,743-1,748.

Becker, E.W. 1994. **Biotechnology and Microbiology**. Cambridge Univercity Press.

Bednarski, W., Leemen, J. and Tomasik, J. 1986. "Utilization of beet molasses and whey for fat biosynthesis by a yeast." **Agricultural Wastes**. 18 : 19-26.

Bernard, C. 1998. "Opportunities for microbial lipids." **JAOCS**. 65 (10) : 1,584-1,586.

Botham, P.A. and Ratledge, C. 1979. "A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganism." **J. Gen. Microbiol.** 114 : 361-375.

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

Certik, M. and Shimizu, S. 2000. "Kinetic analysis of oil biosynthesis by an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* is-4." **Appl. Microbiol Biotechnol.** 54 : 224-230.

Certik, M., Adrasi, P. and Sarjbidor, J. 1996. "Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing γ-linolenic acid extracted from fungi." **JAOCS**. 73 (3) : 357-364.

Davies, R.J., Holdworth, J.E. and Reader, S.L. 1990. "The effect of low oxygen up take rate on the fatty acid profile of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33 : 569-573.

Davila, A.M., Marchal, R. and Vandecasteele, J.P. 1992. "Kinetic and balance of a fermentation free from product inhibition : sophorose lipid production by *Candida bombicola*." **Appl. Microbiol Biotechnol.** 38 : 6-11.

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

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

Eroshin, V.K. and Krylova, N.I. 1983. "Efficiency of lipid synthesis by yeasts." **Biotechnology and Bioengineering**. 25 : 1,693-1,700.

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

Floetenmeyer, M.D., Glatz, B.A. and Hammond, E.G. 1985. "Continuous culture fermentation of whey permeate to produce microbial oil." **J. Dairy Sci.** 68 : 633-637.

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

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

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

Granger, L.M., Perlot, P., Goma, G. and Pareilleux, A. 1993.(a) "Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts : production of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method." **Biotechnology and Bioengineering.** 42 : 1,151-1,156.

Granger, L.M., Perlot, P., Goma, G. and Pareilleux, A. 1993.(b) "Effect of various nutrient limitation on fatty acid production by *Rhodotorula glutinis*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38 : 784-789.

Grima, E.M., Medina, A.R., Gimenez, A.G.M., Perz, J.A.S. and Camacho, F.G. 1994. "Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass." **JAOCS.** 71 (9) : 955-959.

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

Hammond, E.G., Glatz, B.A., Choi, Y. and Teasdele, M.T. 1981. **New source of fat and oils : oil production by *Candida curvata* and extraction composition and properties of the oil.** In eds Prydeg E. H.Pricen, L.H. and Mukherjee, K.D. American Oil Chemists' Society Champaign, IL. pp. 171-185.

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

Hatzinikolaou, D.G. 1999. "A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells:production, partial characterization and aplication in the synthesis of esters." **J. of Bioscience and Bioengineering.** 88 (1) : 53-56.

Hommel, R.K., Stegner, S., Weber, L. and Kleber, H.P. 1994. "Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42 : 192-197.

Hussein, H.S., Mackie, R.I., Merchen, N.R., Banker, D.H. and Persons, L.M. 1995. "Effect of oleaginous yeast on growth performance, fatty acid composition of muscles and energy utilization by poultry." **Bioresource Technology.** 55 : 125-130.

Jham, G.N., Teles, F.F.F., and Campus, C.G. 1982. "Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acid derived from soybean lipids." **JAOCS.** 59 (3) : 132-133.

Kamel, B.S. and Kakuda, Y. 1994. **Yeast, Molds, Algae and Bacteria as Source of Lipids.** In eds. C. Ratledge, Blackie Academic and Professional, pp. 235-283.

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

Kim, S.Y., Oh, D.k., Lee, K.H. and Kim, J.H. 1997. "Effect of soybean oil and glucose on sophomore lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48 : 23-26.

Kwon, D.Y. and Rhee, J.S. 1986. "A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay." **JAOCS.** 63 (1) : 89-92.

Kyle, D.J. and Ratledge, C. 1991. **Industrial Application of Single Cell Oils.** Chemists' Society-Champaign Illinois.

Lachance, M.A. 1993. **Yeast Strain Selection : Yeast Selection in Nature.** In eds. Panchal C.J. Marcel Dekker, Inc. pp. 21-44.

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

Legmann, R.N. and Margalith, P. 1987. "A comparative study of the lipid composition of yeasts with different fermentation capacities." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 26 : 49-54.

Leman, J. 1997. **Advances in Applied Microbiology Volume 43.** Academic Press, Inc.

Lowry, R.R. and Tinsley, I.J. 1975. "Rapid colorimetric determination of free fatty acids." **JAOCS.** 53 : 470-472.

Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. 1997. "Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions." **JAOCS.** 74 (7) : 887-889.

Meesters, P.A.E.P. and Huijberts, G.N.M. 1996. "High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45 : 575-579.

Mercade, M.E. and Manresa, M.A. 1994. "The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production." **JAOCS.** 71 (1) : 61-64.

Misra, Ghosh, A. and Dutta, J. 1984. "Production and composition of microbial fat from *Rhodotorula glutinis*." **J. Food Agric.** 35 : 59-65.

Miyazima, M.,Iida, M. and Iizuka, S. 1985. "Effects of n-alkane on compositions of cellular non-polar lipids in *Aspergillus* sp. Isolated from soils." **J. Ferment Technol.** 63 (3) : 225-229.

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

Moreton, R.S. 1985. "Modification of fatty and composition of lipid accumulating yeasts with cyclopropene fatty acid desaturase inhibitors." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 22 : 41-45.

Moreton, R.S. 1989. "Yeast lipid estimation by enzymatic and nuclear magnetic resonance methods." **Appl. And Environmental Microbiology.** 55 (11) : 3,009-3,011.

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

Nakahara, T., Yokochi, T., Higachihara, T., Tanaka, S., Yaguchi, T. and Honda, D. 1996. "Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from yap islands." **JAOCS**. 73 (11) : 1,421-1,426.

Okuyama, H. and Saito, M. 1979. "Regution by tempurature of the chain length of fatty acids in yeast." **The J. of Biological Chemistry**. 254 (24) : 1,281-1,284.

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

Park, W.S., Murphy, P.A. and Glatz, B.A. 1990. "Lipid metabolism and cell composition of oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown at different carbon to nitrogen ratios." **Can. J. Microbial.** 36 : 318-326.

Phaff, H.J. and Starmer, W.T. 1987. **The Yeasts : Yeasts Associated with Plants, Insects and Soil.** In eds. Rose A.H. Academic Press. pp. 123-174.

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

Prescott and Dunn. 1982. **Industrial Microbiology 4 $^{ed}$**. The AVI Publishing Company INC. USA.

Punpeng, B.,Nakata, Y.,Goto, M.,Teramoto, Y. and Hayashida, S. 1992. "A novel raw starch digesting yeast α-amylase from *Lipomyces starkeyi* HN-606." **J. of Fermentation and Bioengineering.** 73 (2) : 108-111.

Randhir, S.M. and Swaranjit, S.C. 1997. "Utilization of molasses for biosurfactant production by *Bacillus* strains at thermophilic conditions." **JOACS**. 74 (7) : 887-889.

Ratledge, C. 1981. **Yeast and Mould as Sources of Oils and Fats : New Sources of Fat and Oils**. In eds. Mukherjee, K.D. American Oil Chemists' Society Champainge, IL. pp. 159-169.

Ratledge, C. 1987. "Lipid biotechnology : A wonderland for the microbial physiologist." **JAOCS**. 64 (12) : 1,647-1,656.

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

Ratledge, C. and Hall, M.J. 1977. "Oxygen demand by lipid accumulating yeasts in continous culture." **Appl. and Environment. Microbiol.** 34 (2) : 230-231.

Ratledge, C. and Tan, K.H. 1990. **Oils and Fats : Production, Degradation and Utilization by Yeasts.** In eds. H. Verachtert and Rene de Mot, Marcel Dekker Inc, pp. 223-251.

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

Shimizu, S., Kawashima, H., Shinmen, Y., Akimoto, K. and Yamada, H. 1988. "Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi." **JAOCS.** 65 (9) : 1,455-1,459.

Shimizu, S., Kawashima, H., Shinmen, Y., Akimoto, K. and Yamada, H.Jarfonkimongkol, S. 1989.(a) "Stimulatory effect of peanut oil on the production of dihomo-γ-linolenic acid by filamentous fungi." **Agric. Biol. Chem.** 53 (5) : 1,437-1,438.

Shimizu, S., Kawashima, H.,Shinmen, Y., Akimoto, K. and Yamada, H. 1989.(b) "Production of dihomo--γ-linolenic acid by *Mortierella alpina* IS-4." **JOACS.** 66 (2) : 237-241.

Shirasaka, N. and Shimizu, S. 1995. "Production of eicosapentaenoic acid by *Saprolegnia* sp. 28YTF-1." **JAOCS.** 72 (12) : 1,545-1,549.

Sobus, M.T. and Holmlund, C.E. 1975. "Extraction of lipids from yeast." **Lipids.** 11 (4) : 341-348.

Suutari, M., Liukkonen, K. and Laakso, S. 1990. "Temperature adaptation in yeast : the rule of fatty acid." **J. Gen. Microbiol.** 136 : 1,469-1,474.

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

Suutari, M., Rintamaki, A. and Laakso, S. 1996. "The effect of temperature on lipid classes and their fatty acid profiles in *Lipomyces starkeyi*." **JAOCS.** 73 (8) : 1,071-1,075.

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

Walker, G.M. 1998. **Yeast : Phisiology and Biotechnology.** In eds. Wiley and Sons Ltd. pp. 232-239.

Ward, O. 1995. "Microbial production of long–chain PUFAs." **Inform.** 6(6) : 683-688.

William, M. and Kelly, C.T. 1990. **Microbial Enzymes and Biotechnology** 2$^{ed}$. Science Publishers Ltd. Esser, England.

Yaguchi, T., Tanaka, S., Yokochi, T.and Higashihara, T. 1997. "Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Shizochytrium* sp. strain SR21." **JAOCS.** 74 (11) : 1,413-1,434.

Yamamura, R. and Shimomura, Y. 1997. "Industrial high-performance liquid chromatography purification of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosapentaenoic acid ethyl ester from single cell oil." **JAOCS.** 74 (11) : 1,435-1,440.

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

Yazawa, K., Araki, K., Okazaki, N., Watanabe, K., Ishikawa, C., Inove, A., Numao, N. and Kondo, K. 1988. "Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria." **J. Biochem.** (103) : 5 - 7.

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

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

# ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **สูตรอาหารเหลวเพื่อใช้แยกเชื้อยีสต์** (starch brouth pH 5.5 )

| | | |
|---|---|---|
| Yeast Extract | 2 | กรัม |
| แป้งมันสำปะหลัง | 50 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 7 | กรัม |
| $CaCl_2$ | 0.2 | กรัม |
| $NH_4Cl$ | 2.5 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 1 | กรัม |
| Trace element | | |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 0.5 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0.5 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 0.7 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

ปรับพีเอชเท่ากับ 3.5 หรือ 5.5 ด้วยกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 หัวเชื้อเตรียมเช่นเดียวกันนี้ แต่ใช้แป้งมันสำปะหลังเพียงร้อยละ 3 และให้เติมกลูโคสร้อยละ 2 เพิ่มเข้าไป

2. **สูตรอาหารแข็งที่ใช้แยกเชื้อและเก็บรักษาเชื้อ** (starch agar)

| | |
|---|---|
| Yeast Extract | ร้อยละ 0.3 |
| แป้งมันสำปะหลัง | ร้อยละ 2 |
| $KH_2PO_4$ | ร้อยละ 0.1 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | ร้อยละ 0.05 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | ร้อยละ 0.5 |
| agar | ร้อยละ 1.5 |

ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10

3. **สูตรอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเซลล์คัดเลือกการผลิตไขมัน** (starch brouth pH 5.5)

ใช้ starch brouth ที่มีองค์ประกอบเหมือนกับที่ใช้แยกเชื้อยีสต์ในข้อ 1

4. **สูตรอาหารเหลวที่ใช้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมัน** (starch brouth pH 5.5 )

| | | |
|---|---|---|
| Yeast Extract | 2 | กรัม |
| แป้งมันสำปะหลัง | 50 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 10 | กรัม |
| $K_2HPO_4$ | 0.62 | กรัม |
| $CaCl_2$ | 0.2 | กรัม |
| $NH_4Cl$ | 2.5 | กรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 1 | กรัม |
| Trace element | | |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 0.5 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0.5 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 0.7 | มิลลิกรัมต่อลิตร |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

สำหรับหัวเชื้อเตรียมเหมือนกัน แต่ใช้แป้งมันสำปะหลังเพียงร้อยละ 3 และเติมกลูโคสร้อยละ 2 เพิ่มเข้าไป

# ภาคผนวก ข
## น้ำยาเคมี

1. **สารละลายไอโอดีนเพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อยีสต์ที่แยกได้**

ชั่งโปตัสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร คนให้ละลาย เติมไอโอดีน 1 กรัม คนให้ละลายเข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 300 มิลลิลิตร เวลาใช้ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า

2. **เอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ** 80

ตวงอัลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ความเข้มข้นร้อยละ 99.1 จำนวน 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. 1.5 M KOH **ในเอทธานอลร้อยละ** 80

ชั่งโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 84.165 กรัม ละลายในเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. Copper reagent

ชั่ง cupric acetate 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 6.1 ด้วยไพริดีน ( pyridine) ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองก่อนเก็บไว้ใช้ (สารละลายคงตัวได้ 2 ปี ในที่ไม่มีแสง)

# ภาคผนวก ค
# วิธีการวิเคราะห์

## 1. การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง

ยีสต์ที่แยกได้ซึ่งบริสุทธิ์แล้วนำมาเทราดด้วยสารละลายไอโอดีนที่เตรียมไว้ 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที สังเกตโคโลนีที่ให้บริเวณใสแสดงว่าให้ผลเป็นบวกกับสารละลายไอโอดีน แสดงว่ามีความสามารถในการย่อยแป้ง

## 2. การทำ cell suspension เซลล์ยีสต์ 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งน้ำหนักเซลล์เปียก 1 กรัม ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

## 3. การหาน้ำหนักแห้ง

นำ cell suspension ส่วนหนึ่งไปหาไขมัน อีกส่วนหนึ่งนำไปหาน้ำหนักแห้ง โดยจาก cell suspension เซลล์ : น้ำ เท่ากับ 1:1 เจือจางเป็น 1:10 นำ 10 มิลลิลิตร ใส่จานอลูมิเนียมที่อบแห้งและชั่งน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส โดยค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 80 องศาเซลเซียส อบจนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักสุดท้ายลบน้ำหนักจานเริ่มต้น คิดเทียบเป็นปริมาณเซลล์แห้งที่ได้

## 4. การสกัดไขมันจากเซลล์ยีสต์ไขมัน

การสกัดไขมันจากเซลล์ยีสต์ทำโดยการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์และสกัดไขมันออกจากเซลล์โดยการซาพอนนิฟิเคชั่นด้วย 1.5 M KOH ในเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ทำโดยนำ cell suspension ของยีสต์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดจุกเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร เติม 1.5 M KOH ในเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 จำนวน 4 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น ต้มให้เดือด 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลงเติม 2.5 M HCl 6 มิลลิลิตร และ isooctane 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 200-300 ครั้งต่อนาที เพื่อสกัดไขมันอิสระออกมาอยู่ในชั้นของ isooctane เพื่อนำไปหาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดโดยวิธี colorimetric ต่อไป

## 5. การหาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดด้วยวิธี colorimetric method (ดัดแปลงจาก อัจฉราวรรณ ทองมี. 2530)

1. สารละลายกรดไขมันมาตรฐาน (stock standard) 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดปาลมิติค 0.5 กรัม ละลายในไอโซออกเทน (isooctane) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. ทำ working standard

จากสารละลายกรดปาลมิติค 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยไอโซออกเทน

| ความเข้มข้นของกรดปาลมิติค (มก./3 มล. ของสารละลาย) | 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 |

จากนั้นแต่ละระดับความเข้มข้นมา 3 มิลลิลิตร เติม copper reagent 1.0 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าหลอดแรง ๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่ จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐาน

3. การหาปริมาณกรดไขมันในเซลล์ยีสต์

ทำโดยปิเปตสารละลายที่สกัดกรดไขมันจากยีสต์มา 3 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ copper reagent 1 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าแรง ๆ 1-2 นาที ทิ้งไว้สักครู่จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันกับกราฟมาตรฐาน

6. **การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้** continuous soxhlet extraction apparatus (AOAC. 1995)

วิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

1. ชั่งตัวอย่างที่แห้งและบดละเอียด 2-5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองแล้วใส่ในทิมเบิล (thimble) ของชุดสกัดไขมัน

2. ใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายเพื่อสกัดไขมันออกจากเซลล์โดยเติมเฮกเซนในบีกเกอร์ไขมันที่อบแห้ง และชั่งน้ำหนักแน่นอนแล้วประมาณ 180 มิลลิลิตร

3. ต่อชุดสกัดเข้ากับคอนเดนเซอร์

4. ทำการสกัดไขมันจนแน่ใจว่าสกัดไขมันออกมาได้มากที่สุด (ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 8 ชั่วโมง)

5. นำบีกเกอร์ไขมันที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้หมด แล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

$$\text{ร้อยละไขมันโดยน้ำหนักแห้ง} = \frac{\text{ปริมาณไขมันที่สกัดได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

## 7. การสกัดไขมันเพื่อนำไขมันไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

ทำการสกัดโดยใช้ soxhlet extraction เช่นเดียวกัน แต่ให้ทำการไล่ตัวทำละลายโดยใช้ rotary evaporator ร่วมกับการใช้ก๊าซไนโตรเจนเพื่อป้องกันการออกซิเดชัน

## 8. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีการกลั่นด้วยเครื่องวิเคราะห์โปรตีน Kjeldahl distillation apparatus (AOAC. 1995)

ชุดวิเคราะห์โปรตีน Buchi- Kjeldahl-System

สารเคมี

1. กรดซัลฟุริกเข้มข้น
2. กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 2
3. กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 N
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 32
5. แคตตาลีสผสม : ผสมซีลีเนียมไดออกไซด์ ($SeO_2$) 2.5 กรัม โปตัสเซียมซัลเฟตความเข้มข้น ($K_2SO_4$) 100 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)
6. อินดิเคเตอร์ผสม

ก. เตรียม Bromocresol green ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ทำได้โดยเตรียม Methyl red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

ข. นำ Bromocresol green ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมกับ Methyl red จำนวน 1 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5 กรัม ใส่หลอดย่อยโปรตีน
2. เติมแคตตาลีสผสม 5 กรัม กรดซัลฟุริก 15 มิลลิลิตร และ glass bead
3. นำเข้าชุดย่อยทำการย่อยจนได้สีฟ้าใส ทิ้งให้เย็น

4. นำมาเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมด่างเข้มข้น (NaOH ร้อยละ 32) จำนวน 60 มิลลิลิตร เข้าเครื่องกลั่น ทำการกลั่นโดยใช้กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 2 จำนวน 60 มิลลิลิตร ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ผสมประมาณ 2-3 หยด เป็นตัวดักเก็บก๊าซแอมโมเนียที่ได้

5. นำส่วนที่กลั่นได้ไปไตเตรทกับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.01 N ไตเตรทจนกระทั่งสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีใสหรือไม่มี

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = \frac{N_{HCl} \times \text{ปริมาตรกรด } (ml_{HCl}) \times 14 \times 100}{\text{ตัวอย่าง (มิลลิกรัม)}}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \%N \times 6.25$$

9. **วิธีวิเคราะห์ค่าซาพอนนิฟิเคชัน** (Saponification value)

สารเคมี

1. alcoholic potassium hydroxide

ชั่งโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 35-40 กรัม ละลายน้ำกลั่นจำนวน 20 มิลลิลิตร เติมเอทธิลอัลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ให้ครบ 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น ถ้าขุ่นให้ทิ้งค้างคืนเทส่วนใสมาใช้

2. สารละลายมาตรฐาน 0.5 M HCl

3. ฟีนอฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการ

ชั่งน้ำมันตัวอย่างประมาณ 2 กรัม (4 ตำแหน่ง) ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอัลกอฮอล์ และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร ปิดจุกต่อกับชุดรีฟลักซ์ รีฟลักซ์ 30 นาที ใน boiling water baths เขย่าเป็นระยะ เมื่อครบ 30 นาที นำไปไตรเตรทกับ 0.1 N $Na_2S_2O_3$ จดปริมาตร 0.5 N HCl มาตรฐานที่ใช้เท่ากับ A และที่ใช้กับ Blank เท่ากับ B

$$SV = \frac{(B-A) \times 28.05}{W \text{ กรัม}}$$

10. **วิธีวิเคราะห์ค่าของกรด** (Acid value)

สารเคมี

1. diethyl ether
2. อัลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95
3. ฟีนอฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1
4. 0.1 N NaOH

วิธีการ

1. เตรียมตัวทำละลายผสมโดยใช้ diethyl ether 25 มิลลิลิตร ผสมกับอัลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 25 มิลลิลิตร เติมฟีนอฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ไตเตรทตัวทำละลายผสมให้เป็นกลางด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH (ประมาณ 2-3 หยด)

2. ชั่งตัวอย่างน้ำมัน (4 ตำแหน่ง) ประมาณ 2-5 กรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งแห้งสนิท เทตัวทำละลายผสมที่เป็นกลางนี้ลงไป แล้วไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH เขย่าขณะไตเตรท ไตเตรทจนได้สีชมพูคงตัว 15 วินาที จดปริมาตรด่างที่ใช้

การคำนวณ

$$AV = \frac{V \times 5.61}{W}$$

V = ปริมาตรของ 0.1 N NaOH ที่ใช้

W = น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

ถ้าต้องการคำนวณเป็นปริมาณของกรดไขมันอิสระให้คำนวณในรูปของเปอร์เซ็นต์ปาลมิติค (ใช้กับน้ำมันปาล์ม) หรือกรดลอริค (ใช้กับน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันปาล์ม kernel) หรือกรดโอเลอิค (ใช้กับน้ำมันอื่น ๆ) คำนวณจากค่ามาตรฐานดังนี้ 1 มิลลิลิตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N ทำปฏิกิริยาสมมูลกับกรดโอเลอิค 0.028 กรัม หรือกรดปาลมิติค 0.0256 กรัม หรือกรดลอริค 0.0200 กรัม

โดยปกติน้ำมันจะมีกรดไขมันอิสระประมาณ 0.5-1.5 เปอร์เซ็นต์ในรูปของกรดโอเลอิค

11. **วิธีวิเคราะห์ค่าไอโอดีนโดยวิธี** Wijs' method (Iodine value)

สารเคมี

1. Wijs' solution

ละลายไอโอดีนไตรคลอไรด์ 8 กรัม ในกรดอะซิติก (glacial) 200 มิลลิลิตร และละลายไอโอดีน 9 กรัม ในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ 300 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งสองมาผสมเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยกรดอะซิติก

2. สารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์ความเข้มข้นร้อยละ 10

เตรียมโดยชั่งโปตัสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัม ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. โซเดียมไธโอซัลเฟตมาตรฐาน 0.1 M

ชั่งโซเดียมไธโอซัลเฟต 24.82 กรัม ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 1 ลิตร

4. น้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1

ชั่งแป้ง 1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มเดือด ทิ้งให้เย็นก่อนใช้ โดยเตรียมทันทีก่อนใช้

<u>วิธีการ</u>

ชั่งน้ำมันตัวอย่าง (5-10 หยด) อย่างถูกต้อง 4 ตำแหน่ง ใส่ฟลาสก์ขนาด 400 มิลลิลิตร เติมคาร์บอนเตตระคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้น้ำมันละลาย แล้วเติมสารละลาย Wijs' 20 มิลลิลิตร โดยใช้ filter pipette ที่แห้งสนิท เขย่าอย่างเร็ว ปิดจุกเก็บในที่มืด (25 องศาเซลเซียส) 30 นาที หรือมากกว่าเท่ากับ 1 ชั่วโมงในตัวอย่างที่มีค่าไอโอดีนมากกว่า 150 จากนั้นนำมาเติมโปตัสเซียมไอโอไดด์ 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปไตเตรทหาไอโอดีนที่เหลือด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต โดยเขย่าฟลาสก์ตลอดเวลาที่ทำการไตเตรท เมื่อได้สีเหลืองอ่อนหยุดไตเตรท เติมน้ำแป้ง 2-3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์เขย่าจนกลายเป็นสีฟ้า แล้วไตเตรทต่ออย่างระมัดระวังโดยเขย่าตลอดเวลา ไตเตรทจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นไม่มีสี สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้กับน้ำมันตัวอย่างเท่ากับ a และที่ใช้กับ blank เท่ากับ b (ทำ blank และตัวอย่าง อย่างละ 2 ซ้ำ)

<u>การคำนวณ</u>

$$IV = \frac{(b-a) \times 1.269}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ถ้า $b-a > b/2$ ต้องทำใหม่โดยใช้ตัวอย่างน้ำมันให้น้อยลง

12. **วิธีวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์** (Peroxide value)

<u>สารเคมี</u>

1. กรดอะซิติก : คลอโรฟอร์ม (3:2)
2. สารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์อิ่มตัว

สารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์มากพอในน้ำต้มสุกใหม่ เก็บในที่มืด

3. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตมาตรฐาน 0.1 N

4. น้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมัน 5.00±0.05 กรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายผสมของกรดอะซิติก : คลอโรฟอร์ม (3:2) จำนวน 30 มิลลิลิตร เขย่าให้น้ำมันตัวอย่างละลาย

3. เติม 0.5 มิลลิลิตร สารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์อิ่มตัว เขย่า 1 นาที

4. เติมน้ำ 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตมาตรฐาน โดยเขย่าตลอดเวลา ไตเตรทจนสีเหลืองจางหาย เติม 0.5 มิลลิลิตร น้ำแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 แล้วไตเตรทต่อจนสีน้ำเงินหาย ถ้าใช้ 0.1 N $Na_2S_2O_3$ < 0.5 มิลลิลิตร ให้ทำการทดลองใหม่ โดยไตเตรทด้วย 0.01 N $Na_2S_2O_3$ แทน

6. ทำ blank (โดย blank ควรจะใช้ 0.1 N $Na_2S_2O_3 \leq 0.1$ มิลลิลิตร)

การคำนวณ

$$PV = A\text{-}B / W$$

A= ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตมาตรฐานที่ใช้กับตัวอย่าง

B= ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้กับ blank

W= ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

## 13. การวิเคราะห์กรดไขมันโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (สถาบันอาหาร แขวงบางยี่ขัน เขตบางพลัด กรุงเทพฯ)

สารเคมี

1. โบรอนไตรฟลูออไรด์รีเอเจนต์ (Boron trifluoride reagent)

ละลายไตรฟลูออไรด์ 125 กรัม ละลายในเมทธิลเอสเทอร์ 1 ลิตร

2. Methanolic sodium hydroxide solution (0.5 N)

ละลาย 2 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ใน 100 มิลลิลิตร เมทธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95

3. เฮปเทน-เฮกเซน

4. ไนโตรเจน (มีออกซิเจน < 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

วิธีการ

1. การเตรียมเมทธิลเอสเทอร์

ชั่งตัวอย่างประมาณ 350 มิลลิกรัม ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Methanolic sodium hydroxide จำนวน 6 มิลลิลิตร และใส่ boiling chip ต่อเข้ากับคอนเด็นเซอร์ ทำการรีฟลักซ์จนไม่ปรากฏเห็นเม็ดไขมัน (5-10 นาที) เติมโบรอนฟลูออไรด์ 7 มิลลิลิตร ผ่านคอนเด็นเซอร์ แล้วต้มต่ออีก 2 นาที และเติมเฮปเทน 2-5 มิลลิลิตร ต้มต่ออีก 1 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติม 15 มิลลิลิตร น้ำเกลืออิ่มตัว ปิดจุก เขย่า 15 นาที จนอุ่น เติมน้ำเกลืออิ่มตัวเพื่อทำให้สารละลายเฮปเทนลอยขึ้นมาอยู่ชั้นบน ปิเปตสารละลายเฮปเทนชั้นบนมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง (อาจเติม $Na_2SO_4$ เพื่อช่วยกำจัดน้ำออก) จากนั้นเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5-10 เพื่อไว้สำหรับวิเคราะห์

การวิเคราะห์

1. สภาวะในการวิเคราะห์

ใช้แก๊สโครมาโตกราฟฟีแบบ FID (flame ionization detector) คอลัมน์ยี่ห้อ SGE รุ่น BP 20 ขนาดความยาว 30 เมตร x 0.32 มิลลิเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก) และ 0.25 มิลิเมตร (เส้นผ่านศูนย์ภายใน) อุณหภูมิ injector 260 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ detector 300 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มขึ้นทีละ 6 องศาเซลเซียสต่อนาที จนได้อุณหภูมิสุดท้าย 260 องศาเซลเซียส ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สพา ปริมาณการฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร

สแตนดาร์ด เตรียมจากเมทธิลอีเทอร์ ของไขมันมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักและองค์ประกอบแน่นอน วิธีการทำเช่นเดียวกับในตัวอย่าง

**ตารางที่ ค.3** ขนาดของฟลาสก์ จำนวนรีเอเจนต์ และขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมในการใช้เตรียมเมทธิลเอสเทอร์

| จำนวนตัวอย่าง (มิลลิกรัม) | ขนาดฟลาสก์ (มิลลิลิตร) | 0.5 N NaOH (มิลลิลิตร) | $BF_3$ reagent (มิลลิลิตร) |
|---|---|---|---|
| 100-250 | 50 | 4 | 5 |
| 250-500 | 50 | 6 | 7 |
| 500-750 | 100 | 8 | 9 |
| 750-1000 | 100 | 10 | 12 |

ที่มา : AOAC. (1995)

# ภาคผนวก ง

## ตารางผลการทดลอง

**ตารางที่ ง.1** ปริมาณไขมันและน้ำหนักแห้งของยีสต์ที่คัดเลือกได้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

| ระยะเวลาการหมัก (วัน) | น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร) | ไขมัน(ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|---|---|
| 2 | 1.60 | 0.86 | 53.75 |
| 4 | 3.89 | 1.74 | 44.78 |
| 6 | 11.33 | 5.35 | 47.25 |
| 8 | 10.53 | 3.16 | 30.05 |

**ตารางที่ ง.2** ปริมาณไขมันและน้ำหนักแห้งของยีสต์ที่คัดเลือกได้เมื่อแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนหมักที่ 10 องศาเซลเซียส

| อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน | น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร) | ไขมัน(ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|---|---|
| 8:1 | 8.88 | 1.07 | 12.05 |
| 20:1 | 8.64 | 1.91 | 22.10 |
| 40:1 | 7.42 | 1.93 | 26.01 |
| 60:1 | 5.68 | 2.40 | 42.25 |
| 80:1 | 4.36 | 2.12 | 48.62 |

**ตารางที่ ง.3** ปริมาณไขมันและน้ำหนักแห้งของยีสต์ที่คัดเลือกได้เมื่อแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนหมักที่ 15 องศาเซลเซียส

| อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน | น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร) | ไขมัน(ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|---|---|
| 8:1 | 8.78 | 2.47 | 28.13 |
| 20:1 | 8.64 | 2.97 | 34.37 |
| 40:1 | 8.23 | 3.88 | 47.14 |
| 60:1 | 7.96 | 4.80 | 60.30 |
| 80:1 | 7.85 | 4.32 | 55.03 |

**ตารางที่ ง.4** ปริมาณไขมันและน้ำหนักแห้งของยีสต์ที่คัดเลือกได้เมื่อแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนหมักที่ 25 องศาเซลเซียส

| อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน | น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร) | ไขมัน(ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|---|---|
| 8:1 | 11.81 | 5.55 | 47.00 |
| 20:1 | 10.83 | 5.24 | 48.38 |
| 40:1 | 11.06 | 5.69 | 51.44 |
| 60:1 | 8.90 | 4.83 | 54.27 |
| 80:1 | 10.09 | 3.51 | 34.78 |

**ตารางที่ ง.5** ปริมาณไขมันและน้ำหนักแห้งของยีสต์ที่คัดเลือกได้เมื่อแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนหมักที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส)

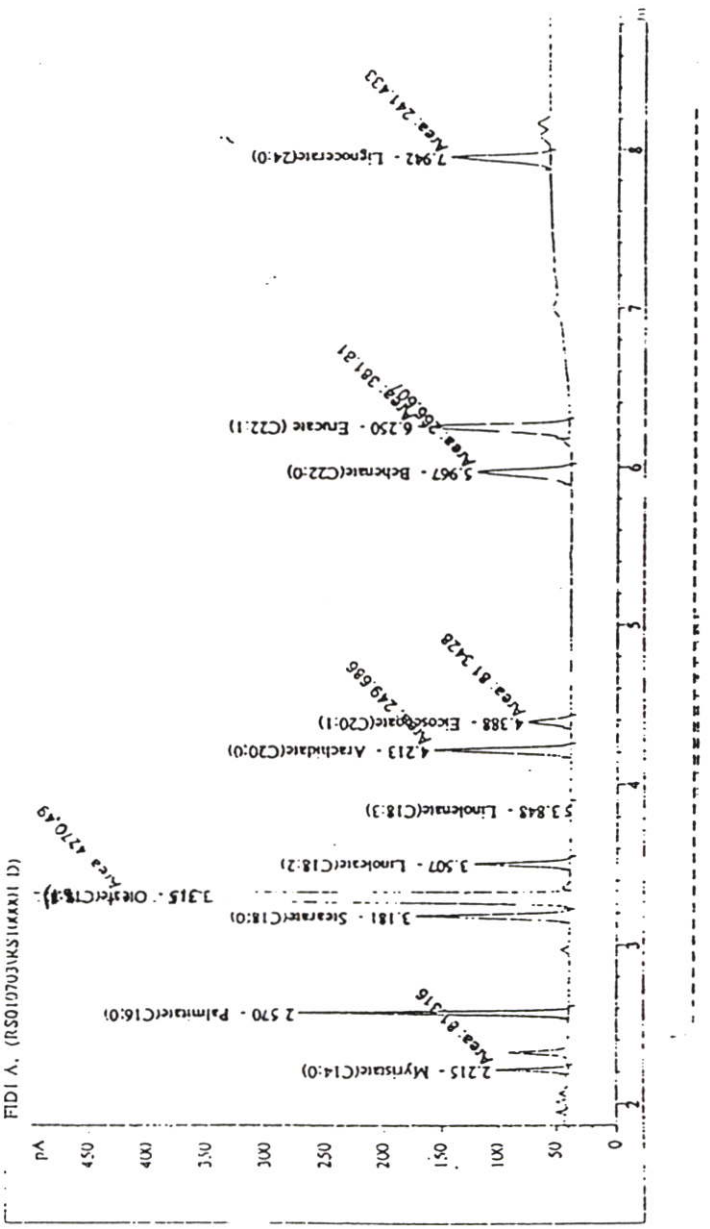
| อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน | น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร) | ไขมัน(ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|---|---|
| 8:1 | 15.26 | 2.48 | 16.25 |
| 20:1 | 12.64 | 2.89 | 22.86 |
| 40:1 | 12.89 | 3.23 | 25.05 |
| 60:1 | 10.94 | 3.95 | 36.10 |
| 80:1 | 5.05 | 2.29 | 45.34 |

**ตารางที่ ง.6** ปริมาณไขมันและน้ำหนักแห้งของยีสต์ที่คัดเลือกได้เมื่อแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนหมักที่ 35 องศาเซลเซียส

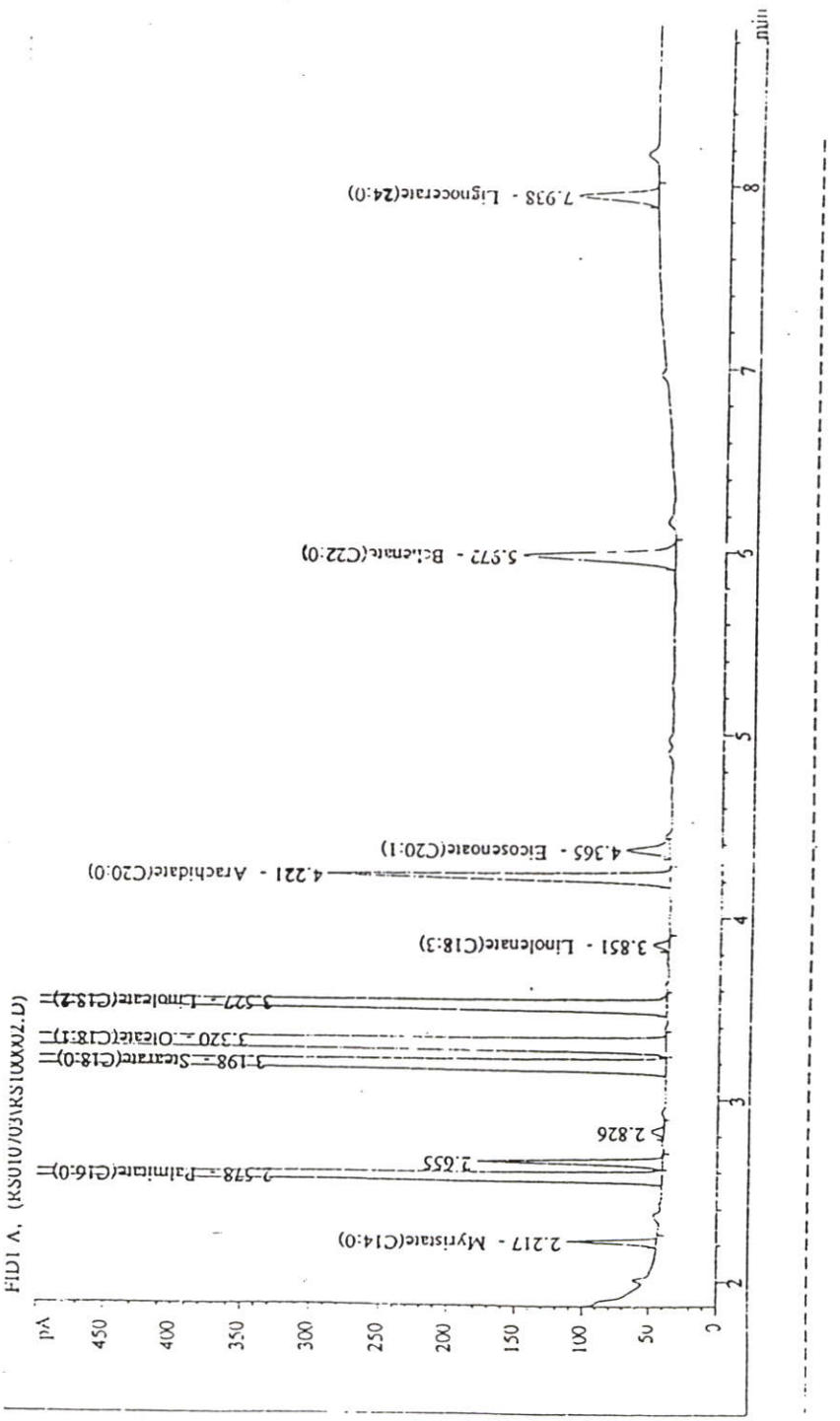
| อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน | น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณไขมัน (กรัมต่อลิตร) | ไขมัน(ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|---|---|
| 8:1 | 17.95 | 2.22 | 12.36 |
| 20:1 | 13.73 | 2.12 | 15.44 |
| 40:1 | 12.94 | 2.24 | 17.31 |
| 60:1 | 12.69 | 4.61 | 36.32 |
| 80:1 | 9.47 | 2.91 | 30.72 |

# ภาคผนวก จ

## โครมาโตแกรมของกรดไขมัน




**รูปที่ จ.1** โครมาโตแกรมของกรดไขมันมาตรฐานวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟฟีแบบ FID (flame ionization detector) คอลัมน์ยี่ห้อ SGE รุ่น BP 20 ขนาดความยาว 30 เมตร x 0.32 มิลลิเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก) และ 0.25 มิลลิเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน) อุณหภูมิ injector 260 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ detector 300 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มขึ้นทีละ 6 องศาเซลเซียสต่อนาที จนได้อุณหภูมิสุดท้าย 260 องศาเซลเซียส ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สพา ปริมาณการฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร




**รูปที่ จ.2** โครมาโตแกรมของกรดไขมันของยีสต์รหัส TD-4 โดยใช้สภาวะเดียวกับรูปที่ จ.1

# ประวัติผู้เขียน

นางสาวบำเพ็ญ นิ่มเขียน เกิดวันที่ 7 สิงหาคม 2513 ที่จังหวัดเพชรบุรี ปีการศึกษา 2532 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการศาสตร์ จากคณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม ปีการศึกษา 2540 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2544