



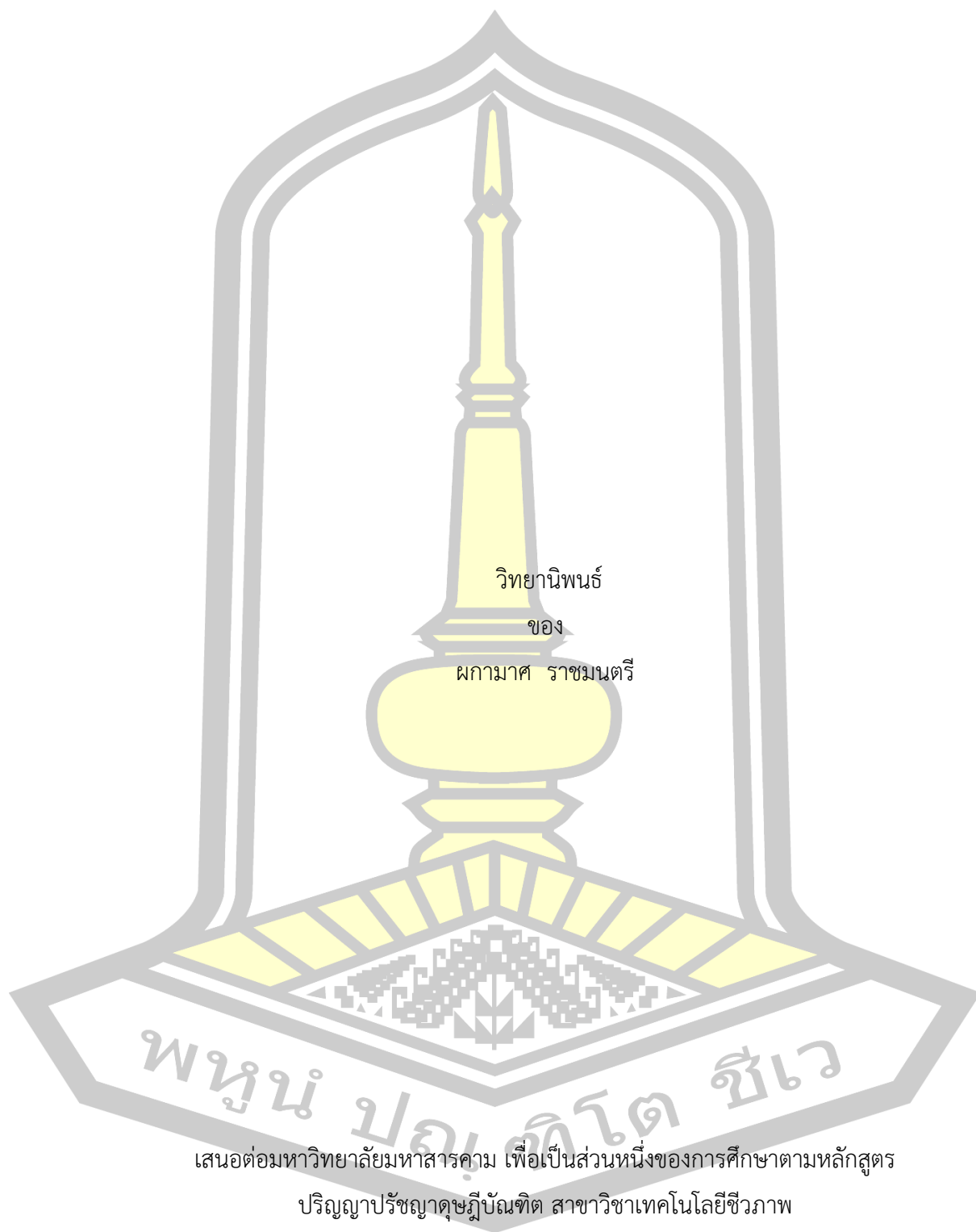
การผลิตไขมันจากไฮโดรไลเซทของเสียทางการเกษตรโดยยีสต์

วิทยานิพนธ์
ของ
พกามาศ ราชมนตรี

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
เมษายน 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การผลิตไขมันจากไฮโดรไลเซทของเสียทางการเกษตรโดยยีสต์



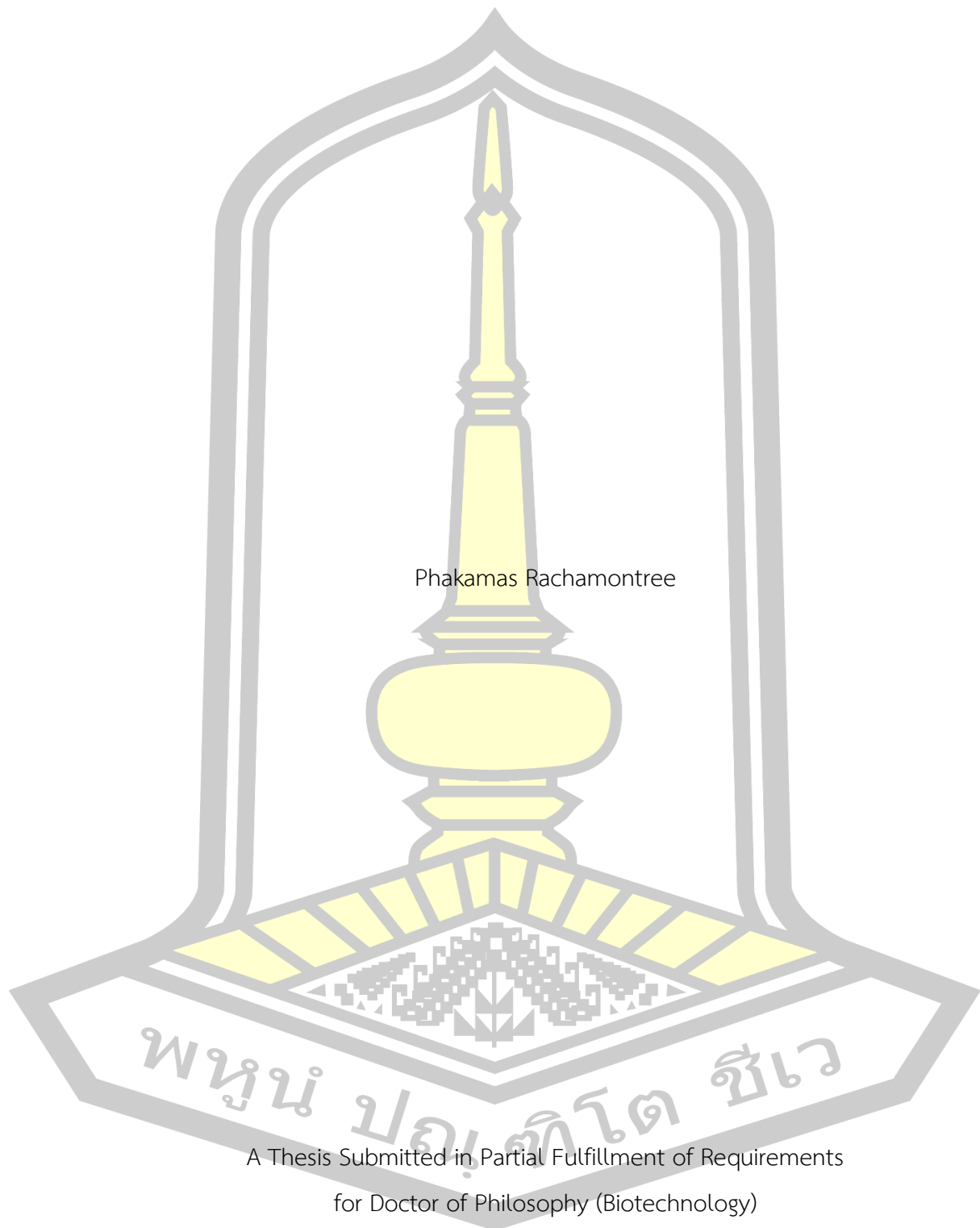
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

เมษายน 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Oil Production Using Agricultural Waste Hydrolysed by a Single Yeast Cell



Phakamas Rachamontree

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Doctor of Philosophy (Biotechnology)

April 2019

Copyright of Maharakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวผกาภาศ ราชมนตรี แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. พรเทพ ถนนแก้ว)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อ. ดร. อิศราภรณ์ สมบุญวัฒน์กุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. มาลินี ศรีอริยพันธ์)

.....กรรมการ

(อ. ดร. เกศสุคนธ์ มณีวรรณ)

.....กรรมการ

(ผศ. ดร. ปริยาภรณ์ อิศรานวัฒน์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(รศ. ดร. อนุชิตา มุ่งงาม)

(ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีคณะเทคโนโลยี

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พูน บัณฑิต ชีวะ

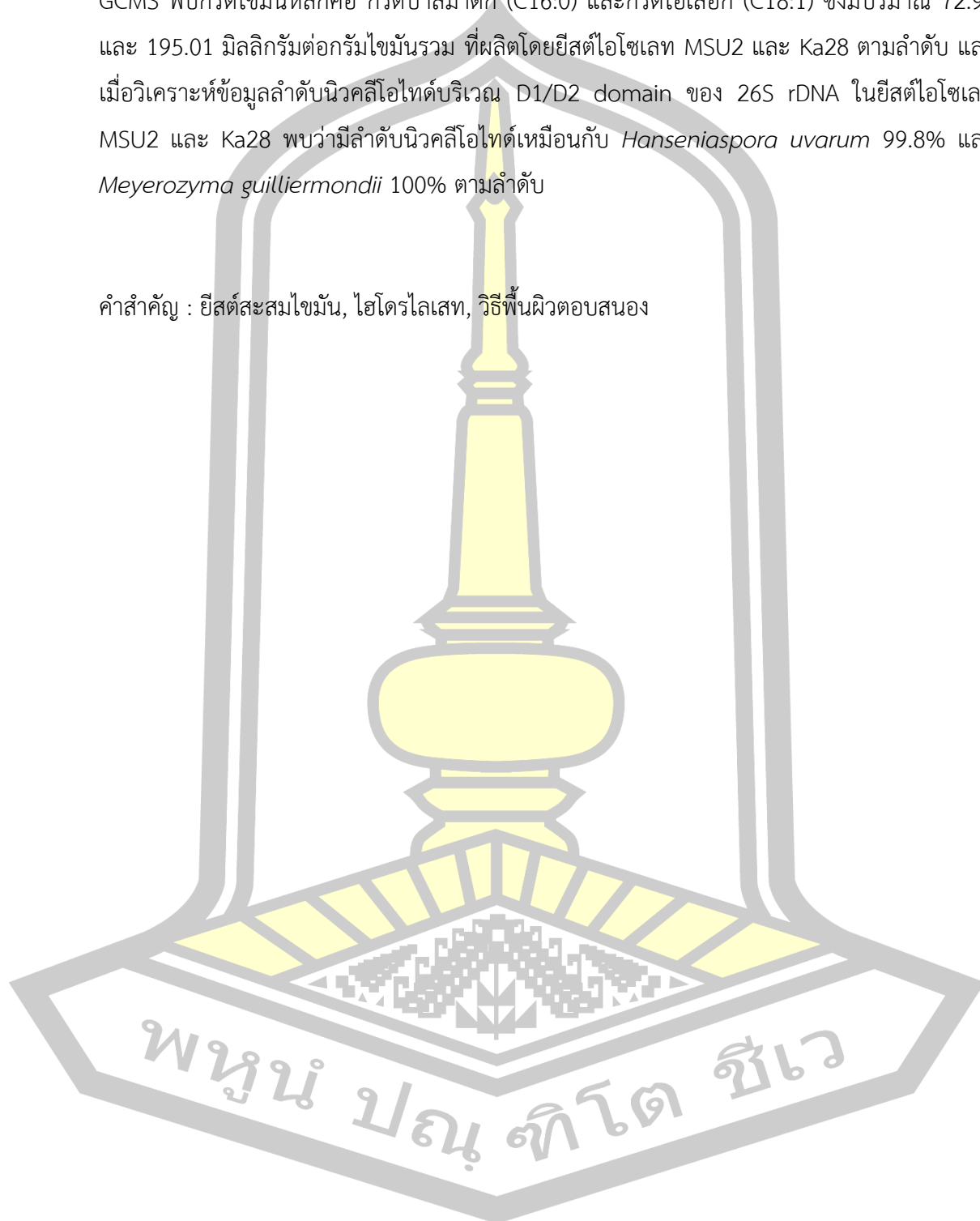
ชื่อเรื่อง	การผลิตไขมันจากไฮโดรไลเซตของเสียทางการเกษตรโดยยีสต์		
ผู้วิจัย	ผกา มาศ ราชมন্ত্রী		
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. อิศราภรณ์ สมบุญวัฒน์กุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาลินี ศรีอริยพันธ์		
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2562

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการใช้ไขมันที่ผลิตจากยีสต์สะสมไขมันเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากให้ผลผลิตสูงและสามารถควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงได้ นอกจากนี้ยีสต์สะสมไขมันยังสามารถเจริญและผลิตไขมันได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนหมุนเวียนซึ่งเป็นการลดต้นทุนการเพาะเลี้ยง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมัน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากไฮโดรไลเซตของเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งสามารถคัดเลือกยีสต์ได้ 2 ไอโซเลท คือ MSU2 และ Ka28 ที่สามารถใช้ไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังและชานอ้อยเป็นสารตั้งต้น ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกปัจจัย 6 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อการผลิตไขมันด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ที่กำหนดค่าปัจจัย 2 ระดับ คือ ระดับปัจจัยที่มีค่าต่ำ (-1) และระดับปัจจัยที่มีค่าสูง (+1) ผลการทดลองของไอโซเลท MSU2 พบว่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณไขมันสะสมในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นำทั้ง 3 ปัจจัย คือ ความเป็นกรดต่าง ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิ มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken เมื่อพิจารณาจากสมการพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันคือ ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 22.84% และอุณหภูมิเท่ากับ 26.28 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 34.56% ส่วนผลการทดลองของไอโซเลท Ka28 พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณไขมันสะสมในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken จากสมการทำนายสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันพบว่าที่น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 53.52 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์เข้มข้น 1.25 กรัมต่อลิตร และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 21.86 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร จะให้ปริมาณไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 21.85% จากนั้น

วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ด้วยเครื่อง GCMS พบกรดไขมันหลักคือ กรดปาล์มาติก (C16:0) และกรดโอเลอิก (C18:1) ซึ่งมีปริมาณ 72.95 และ 195.01 มิลลิกรัมต่อกรัมไขมันรวม ที่ผลิตโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ในยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Hanseniaspora uvarum* 99.8% และ *Meyerozyma guilliermondii* 100% ตามลำดับ

คำสำคัญ : ยีสต์สะสมไขมัน, ไฮโดรไลเอส, วิถีพื้นผิวตอบสนอง



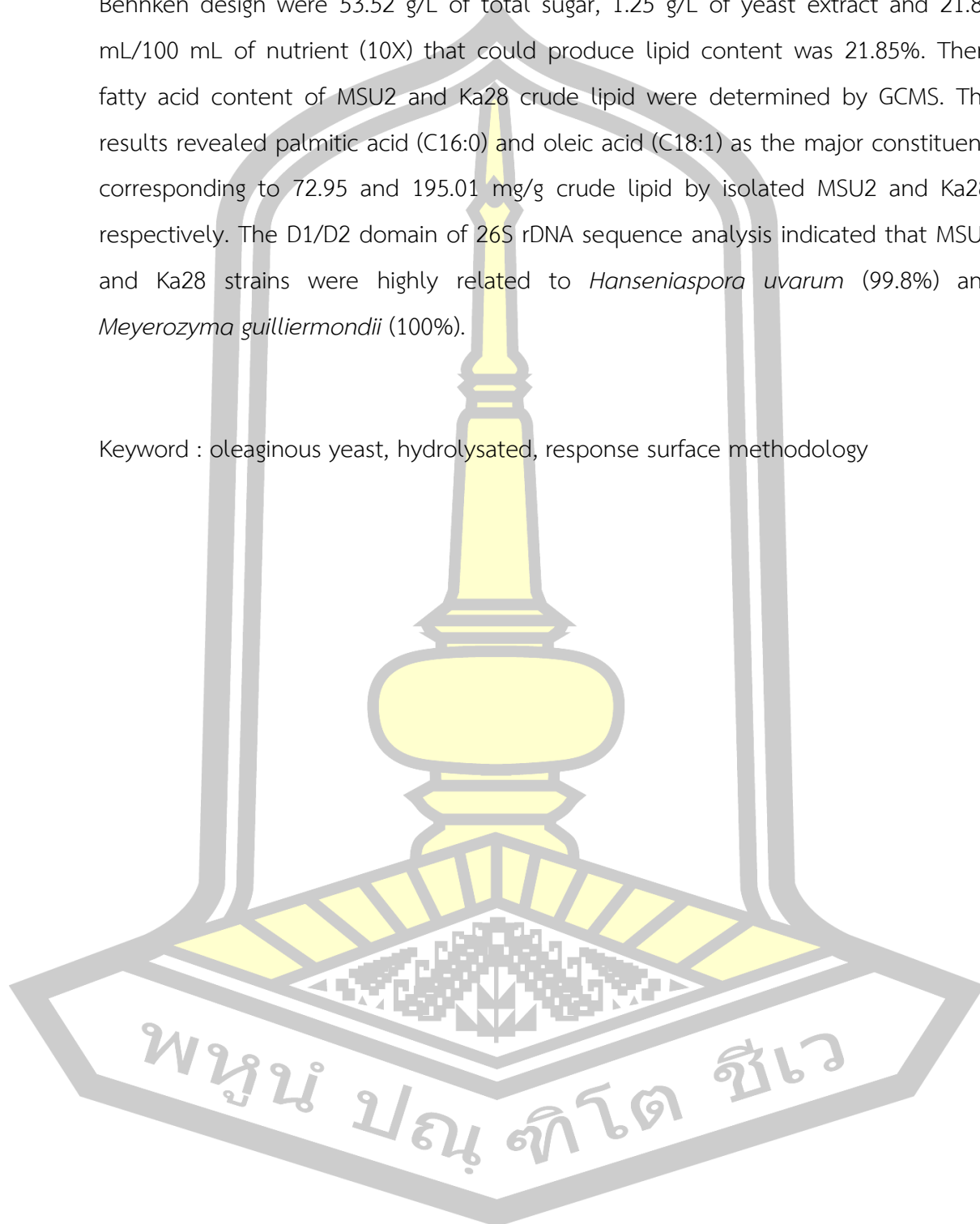
TITLE	Oil Production Using Agricultural Waste Hydrolysed by a Single Yeast Cell		
AUTHOR	Phakamas Rachamontree		
ADVISORS	Issaraporn Sombunwattanukul , Ph.D. Assistant Professor Malinee Sririyanun , Ph.D.		
DEGREE	Doctor of Philosophy	MAJOR	Biotechnology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2019

ABSTRACT

Oleaginous yeast species which can produce lipids is more being an alternative biodiesel. High productivity and controllable culture condition of oleaginous yeast are the majority to increasing consideration. Additional, renewable substrate can be used as carbon source to culture oleaginous yeast which is an inexpensive option. Therefore, this research aims to screening of oleaginous yeast and optimizing of lipid production from agricultural waste hydrolysate by oleaginous yeast using response surface methodology. The selected yeast was isolated, designated as MSU2 and Ka28 which can be used cassava pulp and sugarcane bagasse hydrolysate as feedstock, respectively. The Plackett–Burman design was considered for screening and identifying the significant variables for lipid production. The 6 parameters include total sugar, nitrogen source concentration, nutrient (10X), pH, inoculum size and temperature that each factor was prepared in two levels: -1 for low level and +1 for high level. According to the experimental results, pH, inoculum size and temperature resulted to lipid content of MSU2 by significantly ($p < 0.05$). Three selected variables (pH, inoculum size and temperature) were further experiment in order to maximize the lipid production by the Box–Behnken design of response surface methodology. The predication by equation shows pH 6.57, 22.84% of inoculum size and temperature 26.28°C can get lipid content at 34.56%. However, the experiment of isolated Ka28 revealed that total sugar, yeast extract concentration and nutrient (10X) were the majority parameter on maximum lipid

content by significantly ($p < 0.05$). The estimate optimum conditions using the Box–Behnken design were 53.52 g/L of total sugar, 1.25 g/L of yeast extract and 21.86 mL/100 mL of nutrient (10X) that could produce lipid content was 21.85%. Then, fatty acid content of MSU2 and Ka28 crude lipid were determined by GCMS. The results revealed palmitic acid (C16:0) and oleic acid (C18:1) as the major constituent, corresponding to 72.95 and 195.01 mg/g crude lipid by isolated MSU2 and Ka28, respectively. The D1/D2 domain of 26S rDNA sequence analysis indicated that MSU2 and Ka28 strains were highly related to *Hanseniaspora uvarum* (99.8%) and *Meyerozyma guilliermondii* (100%).

Keyword : oleaginous yeast, hydrolysated, response surface methodology



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วย ความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก อาจารย์ ดร.อิสราภรณ์ สมบุญวัฒนกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ศรีอริยพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.พรเทพ ถนอมแก้ว ประธาน กรรมการสอบ อาจารย์ ดร.เกษศคุณธ์ มณีวรรณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ กรรมการสอบ และคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้คำแนะนำงานวิจัยถูกต้องและ สำเร็จลงได้อย่างสมบูรณ์ จึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ผกา มาศ ราชมนตรี



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
1.5 สถานที่ทำการวิจัย.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ปริทัศน์เอกสารข้อมูล.....	5
2.1 จุลินทรีย์สะสมไขมัน (oleaginous microorganisms).....	5
2.2 ยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeast).....	10
2.3 กระบวนการผลิตไขมันในยีสต์สะสมไขมัน.....	16
2.4 ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose).....	19
2.5 การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส (pretreatment method).....	22
2.6 การออกแบบการทดลองทางสถิติ.....	28
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	34

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	39
3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์.....	39
3.1.1 อุปกรณ์.....	39
3.1.2 เคมีภัณฑ์.....	40
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
3.2.1 การเตรียมไฮโดรไลเซตของเสียทางการเกษตร.....	41
3.2.2 การตัดแยกยีสต์จากตัวอย่าง.....	42
3.2.3 การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเซต.....	43
3.2.4 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากยีสต์ที่คัดเลือกได้.....	43
3.2.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน.....	49
3.2.6 การจัดจำแนกสกุลของยีสต์ทางอนุกรมวิธาน.....	50
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย.....	52
4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบไฮโดรไลเซตของเสียทางการเกษตร.....	52
4.2 ผลการตัดแยกยีสต์จากตัวอย่าง.....	53
4.3 ผลการคัดเลือกยีสต์ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเซต.....	53
4.4 ผลการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากยีสต์ที่คัดเลือกได้.....	56
4.5 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน.....	77
4.6 ผลการจัดจำแนกสกุลของยีสต์ทางอนุกรมวิธาน.....	81
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	84
5.1 สรุปและอภิปรายผล.....	84
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	88
บรรณานุกรม.....	91
ภาคผนวก.....	101
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	102

ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารเคมี	104
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานกลูโคสและวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS ..	107
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง ...	110
ภาคผนวก จ กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกสเปค โทรมิเตอร์	116
ประวัติผู้เขียน	127



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ (lipid content) ของสาหร่ายบางชนิด.....	6
ตารางที่ 2 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ (lipid content) ของยีสต์และราบางชนิด.....	8
ตารางที่ 3 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ (lipid content) ของแบคทีเรียบางชนิด.....	10
ตารางที่ 4 องค์ประกอบของกรดไขมันจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด.....	12
ตารางที่ 5 ปริมาณกรดไขมันในยีสต์บางสายพันธุ์.....	14
ตารางที่ 6 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....	20
ตารางที่ 7 แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง.....	29
ตารางที่ 8 ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรองจำนวน 7 ปัจจัย โดยมีสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 8 การทดลอง.....	29
ตารางที่ 9 ค่าปัจจัยต่างๆ ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2.....	45
ตารางที่ 10 ค่าปัจจัยต่างๆ ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตขานอ้อยโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28.....	45
ตารางที่ 11 แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ของ 6 ปัจจัย จำนวน 16 การทดลอง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2.....	46
ตารางที่ 12 แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ของ 6 ปัจจัย จำนวน 16 การทดลอง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตขานอ้อยโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28.....	47
ตารางที่ 13 องค์ประกอบน้ำตาลชนิดต่างๆ ในไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังและขานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 2% โดยแปรผันแปรผันปริมาณสารตั้งต้นและเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อ.....	52
ตารางที่ 14 แสดงจำนวนไอโซเลทยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGYP.....	53

ตารางที่ 15 แสดงจำนวนไอโซเลทยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง และชานอ้อย	54
ตารางที่ 16 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman จำนวน 16 แผนการทดลอง ด้วย 6 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง	59
ตารางที่ 17 แสดงค่า Variables, estimated effect, regression coefficient, F และ P values ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง ของแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman.....	60
ตารางที่ 18 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman จำนวน 16 แผนการทดลอง ด้วย 6 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อย.....	61
ตารางที่ 19 แสดงค่า Variables, estimated effect, regression coefficient, F และ P values ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อยของแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman.....	62
ตารางที่ 20 ค่าปัจจัยต่างๆ ด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2	63
ตารางที่ 21 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ด้วย 3 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง.....	63
ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken.....	65
ตารางที่ 23 ค่าปัจจัยต่างๆ ด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อยโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28.....	70
ตารางที่ 24 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ด้วย 3 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อย.....	70
ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อยของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken	72

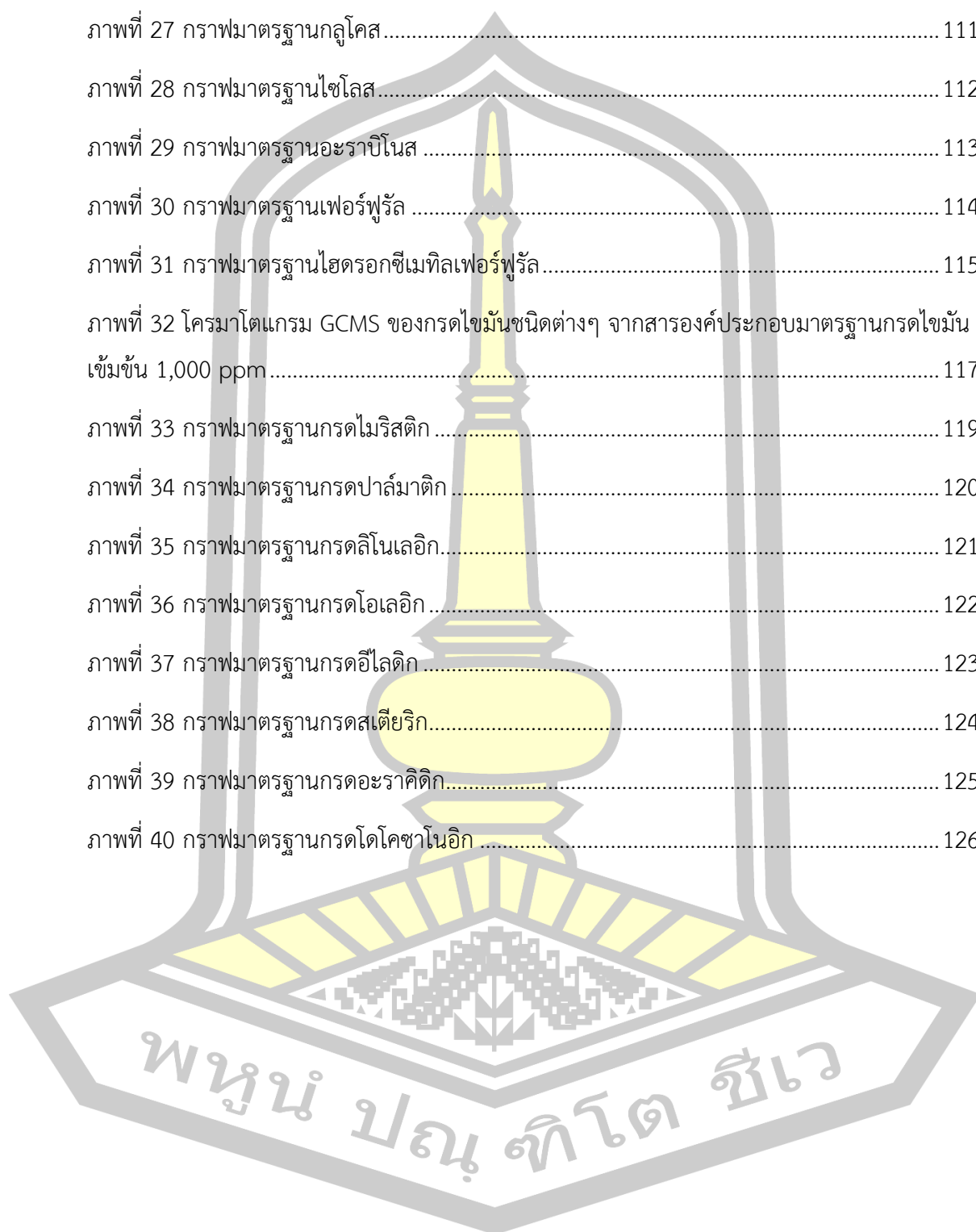
ตารางที่ 26 แสดงผลการวิเคราะห์กรดไขมันเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วย GCMS ที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อย	78
ตารางที่ 27 เปรียบเทียบชนิดกรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28.....	80
ตารางที่ 28 การผลิตไขมันจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ	89
ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ	108
ตารางที่ 30 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ	111
ตารางที่ 31 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ	112
ตารางที่ 32 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานอะราบิโนสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	113
ตารางที่ 33 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเฟอร์ฟูรัลที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	114
ตารางที่ 34 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลที่ความเข้มข้นต่างๆ .	115
ตารางที่ 35 กรดไขมันชนิดต่างๆ ที่ปรากฏในโครมาโตแกรม GCMS ของสารองค์ประกอบมาตรฐานกรดไขมันเข้มข้น 1,000 ppm.....	118
ตารางที่ 36 พื้นที่ใต้กราฟของกรดไมริสติกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	119
ตารางที่ 37 พื้นที่ใต้กราฟของกรดปาล์มติกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	120
ตารางที่ 38 พื้นที่ใต้กราฟของกรดลิโนเลอิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	121
ตารางที่ 39 พื้นที่ใต้กราฟของกรดโอเลอิกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	122
ตารางที่ 40 พื้นที่ใต้กราฟของกรดอีไลดิกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	123
ตารางที่ 41 พื้นที่ใต้กราฟของกรดสเตียริกที่ความเข้มข้นต่างๆ	124
ตารางที่ 42 พื้นที่ใต้กราฟของกรดอะราคิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	125
ตารางที่ 43 พื้นที่ใต้กราฟของกรดโดโคซานอิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	126

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 โครงสร้างของกรดไขมันบางชนิด	14
ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอล	18
ภาพที่ 3 โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของลิกโนเซลลูโลส.....	19
ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสที่ประกอบโมเลกุลของกลูโคส.....	21
ภาพที่ 5 โครงสร้างโมเลกุลของไซแลน	21
ภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างของ (ก) trans-coniferyl alcohol (ข) trans-p-sinapyl alcohol	22
ภาพที่ 7 โมเดลแสดงการกระจายของปัจจัย (ก) คือ แผนการทดลองแบบ Central Composite design (ข) คือ แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design.....	30
ภาพที่ 8 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง... 55	
ภาพที่ 9 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตขานอ้อย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	55
ภาพที่ 10 กราฟการเจริญของยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที.....	56
ภาพที่ 11 การแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง	57
ภาพที่ 12 การแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหาร เลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตขานอ้อย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	57
ภาพที่ 13 การกระจายแบบปกติของค่า Residual ของปริมาณไขมันของยีสต์ไอโซเลท MSU2 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลัง.....	66

ภาพที่ 14 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่างความเป็นกรดต่างเริ่มต้นและปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง	67
ภาพที่ 15 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่างความเป็นกรดต่างเริ่มต้นและอุณหภูมิของยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง.....	68
ภาพที่ 16 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่างปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นและอุณหภูมิของยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง.....	69
ภาพที่ 17 การกระจายแบบปกติของค่า Residual ของปริมาณน้ำมันของยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อย.....	73
ภาพที่ 18 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่างปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและสารสกัดจากยีสต์ของยีสต์ไอโซเลท Ka28	74
ภาพที่ 19 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่างปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ของยีสต์ไอโซเลท Ka28	75
ภาพที่ 20 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่างสารอาหารเข้มข้น 10 เท่าและสารสกัดจากยีสต์ ของยีสต์ไอโซเลท Ka28	76
ภาพที่ 21 โครมาโตแกรม GCMS ของกรดไขมันที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2	77
ภาพที่ 22 โครมาโตแกรม GCMS ของกรดไขมันที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อยโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28.....	78
ภาพที่ 23 ยีสต์ไอโซเลท MSU2 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MGYP (ข) ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	81
ภาพที่ 24 ยีสต์ไอโซเลท Ka28 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MGYP (ข) ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	81
ภาพที่ 25 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28.....	83

ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานกลูโคส.....	109
ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐานกลูโคส.....	111
ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐานไซโลส.....	112
ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐานอะราบิโนส.....	113
ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานเฟอร์ฟูรัล.....	114
ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล.....	115
ภาพที่ 32 โครมาโตแกรม GCMS ของกรดไขมันชนิดต่างๆ จากสารองค์ประกอบมาตรฐานกรดไขมัน เข้มข้น 1,000 ppm.....	117
ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานกรดไมริสติก.....	119
ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานกรดปาล์มาติก.....	120
ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานกรดลิโนเลอิก.....	121
ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก.....	122
ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานกรดอีไลติก.....	123
ภาพที่ 38 กราฟมาตรฐานกรดสเตียริก.....	124
ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานกรดอะราคิติก.....	125
ภาพที่ 40 กราฟมาตรฐานกรดโดโคซานอิก.....	126



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

น้ำมันเชื้อเพลิงเป็นปัญหาสำคัญของโลกรวมถึงประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากกำลังการผลิตไม่เพียงพอกับความต้องการที่สูงขึ้นตามลำดับ ในปัจจุบันจึงเริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับแหล่งพลังงานทดแทนอื่นเพื่อมาทดแทนแหล่งเชื้อเพลิงปิโตรเลียม นั่นคือ น้ำมันไบโอดีเซล เป็นเชื้อเพลิงดีเซลที่ผลิตจากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน เช่น น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือสาหร่าย โดยปกติ น้ำมันไบโอดีเซลผลิตได้จากกระบวนการปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน (transesterification) ของไขมันกินได้หรือจากไขมันกินไม่ได้บางชนิดจากพืช เช่น ปาล์ม ดอกทานตะวัน เมล็ดเรพซิด เป็นต้น อย่างไรก็ตามพืชน้ำมันเหล่านี้คือแหล่งอาหารของคนและสัตว์ มีผลทำให้เกิดข้อจำกัดในการสกัดน้ำมันจากแหล่งต่างๆ เหล่านี้มาผลิตน้ำมันไบโอดีเซล จึงมีความจำเป็นในการที่จะมองหาแหล่งสารตั้งต้นเพื่อนำมาผลิตไบโอดีเซลแหล่งใหม่ที่ไม่กระทบต่อแหล่งอาหารหรือแหล่งพลังงานของคน ดังนั้นปัจจุบันจึงเริ่มมีความสนใจในการศึกษาการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลที่มาจากจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์นั้นใช้พื้นที่น้อยในการเพาะเลี้ยงและใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้น โดเร็ว เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตพลังงานทดแทน และพบว่ามีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่สามารถผลิตและสะสมไขมันในเซลล์ได้ ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมบางประการ (Liang & Jiang, 2013)

จุลินทรีย์สะสมไขมัน (oleaginous microorganism) หมายถึง จุลินทรีย์ที่สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์ (Meng et al., 2009) หรือเรียกว่า Single cell oils (SCOs) กลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ ยีสต์ รา แบคทีเรีย และสาหร่าย (Ma, 2006) จุลินทรีย์จะมีการผลิตไขมัน และสะสมไขมันอยู่ในรูปหยดน้ำมันเล็กๆ (microdroplet oils) ภายในเซลล์ โดยที่เซลล์แบบยูคาริโอต เช่น ยีสต์ รา และสาหร่ายสามารถผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol; TAGs) ที่มีองค์ประกอบคล้ายกับไขมันจากพืช ส่วนเซลล์แบบโพรคาริโอต ได้แก่ แบคทีเรีย จะผลิตไขมันสะสมในเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษ จึงเชื่อว่ายีสต์สะสมไขมันมีศักยภาพที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตไขมันที่จะนำไปพัฒนาในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลต่อไปได้ ส่วนใหญ่มักพบการสะสมไขมันของยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเกินพอ และจำกัดปริมาณสารอาหารอื่นๆ รวมถึงแหล่งไนโตรเจน ภายใต้สภาวะนี้ยีสต์จะใช้แหล่งไนโตรเจนหมดไปอย่างรวดเร็วเพื่อการเจริญ แต่แหล่งคาร์บอนยังคงถูกดึงไปใช้เพื่อการผลิตไขมันอย่างต่อเนื่อง และสะสมไขมันไว้ในไซโทพลาสซึมเป็นหยดน้ำมันเล็กๆ และการสะสมไขมันของยีสต์จะมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์และอาหารในการเพาะเลี้ยงของยีสต์ (Hu, Zhao, Zhao, Wu, & Zhao, 2009) ยีสต์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ส่วนใหญ่

เป็นแซโรไฟต์อาศัยอยู่บนสารอินทรีย์ที่ตายแล้ว หลายชนิดพบในดิน แต่แหล่งที่สามารถพบยีสต์ได้ปริมาณสูง คือ แหล่งที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมักจะปนลงไปในการอาหาร เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียได้

การผลิตไขมันจากยีสต์ยังมีข้อได้เปรียบกว่าการปลูกพืชไขมัน คือ ยีสต์มีช่วงชีวิตสั้นจึงเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เร็ว ใช้แรงงานน้อย ไม่ได้รับผลกระทบจากสภาพอากาศหรือฤดูกาล และพัฒนาการผลิตในระดับขยายส่วนได้ง่าย (Chisti, 2008) กรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeasts) ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันที่มีองค์ประกอบคล้ายกับองค์ประกอบของไขมันจากพืช โดยกรดไขมันเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon compounds) ซึ่งประกอบด้วยธาตุคาร์บอนต่อกันเป็นโซ่ยาวและมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ต่อที่ปลายข้างหนึ่งของโมเลกุล กรดไขมันหลักที่พบในยีสต์และราสะสมไขมันส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) ประกอบด้วยกรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) กรดลิโนเลอิก (linoleic acid; C18:2) และยังพบกรดปาล์มมาติก (palmitic acid; C16:0) หรือกรดปาล์มมีโตเลอิก (palmitoleic acid; C16:1) (Meng et al., 2009) ยีสต์มีความหลากหลายของสายพันธุ์และสามารถใช้สารตั้งต้นราคาถูกเพื่อการเจริญและผลิตไขมัน นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนากระบวนการผลิตไขมันในระดับขยายส่วนได้ง่ายอีกด้วย ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมดังนั้นในแต่ละปีจะมีของเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมทางการเกษตรที่เป็นสารประเภทลิพิดโนเซลล์ูลอสในปริมาณมาก เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย กากมันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งเมื่อผ่านการปรับสภาพด้วยกระบวนการต่างๆ เพื่อการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความพรุนของวัสดุ จนได้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของยีสต์ได้ ซึ่งในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมันโดยสารตั้งต้นราคาถูกจากไฮโดรไลเซตของเหลือทิ้งทางการเกษตรจึงได้รับความสนใจในการศึกษาในครั้งนี้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันสะสมในเซลล์ได้ จากตัวอย่างโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง และโรงงานผลิตน้ำตาล จังหวัดกาฬสินธุ์ ได้แก่ ดิน น้ำทิ้ง กากมันสำปะหลัง ชานอ้อย เป็นต้น

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากไฮโดรไลเซตของเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ชานอ้อยและกากมันสำปะหลัง โดยยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 เก็บตัวอย่างจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง และโรงงานผลิตน้ำตาล จากจังหวัด กาฬสินธุ์ ได้แก่ ดิน น้ำทิ้ง กากมันสำปะหลัง ชานอ้อย เป็นต้น เพื่อทำการคัดแยกยีสต์

1.3.2 คัดเลือก 6 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากไฮโดรไลเซทของเหลือทิ้งทาง การเกษตร แล่งไนโตรเจน สารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ความเป็นกรดต่าง ปริมาณเชื้อตั้งต้น และ อุณหภูมิ ที่ส่งผลต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ทั้งหมด 16 แผนการทดลอง

1.3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากปัจจัยหลักที่ได้โดยยีสต์ที่คัดเลือกได้ ด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ทั้งหมด 16 แผนการทดลอง

1.3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดเลือกได้โดย วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.4.1 จุลินทรีย์ไขมัน (oleaginous microorganisms) คือ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตน้ำมัน สะสมในเซลล์ที่อยู่ในรูปของไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์

1.4.2 ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) คือ สารประกอบชีวมวลที่พบมากในผนังเซลล์ของ พืช ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

1.4.3 ไฮโดรไลเซท (hydrolysate) คือ สารตั้งต้นที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยการ ไฮโดรไลซิส

1.4.4 วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) คือ วิธีการทาง คณิตศาสตร์และสถิติที่นำมาใช้ในการสร้างแบบจำลอง และวิเคราะห์ปัญหาที่เกิดจากความสัมพันธ์ ของตัวแปรหลายตัวแปร เพื่อหาค่าที่ดีที่สุดของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร

1.5 สถานที่ทำการวิจัย

1.5.1 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5.2 ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5.3 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่หาได้ง่ายมาแปรสภาพให้เกิดประโยชน์ โดยใช้เป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงยีสต์สะสมไขมัน เป็นการลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงยีสต์และลดของเสียทางการเกษตรอีกทางหนึ่ง

1.6.2 ได้ผลิตไขมันจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันจากพืช ซึ่งมีประสิทธิภาพในการนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซล แต่มีข้อได้เปรียบ คือ เจริญเติบโตได้ดีและเร็ว มีช่วงการเจริญเติบโตสั้น ทั้งยังเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่าย ซึ่งมีความเหมาะสมกับการนำมาเป็นทางเลือกในการผลิตไขมันเพื่อใช้ผลิตไบโอดีเซลต่อไป และจะช่วยลดปัญหาการแก่งแย่งพืชน้ำมันอันจะก่อให้เกิดภาวะพืชอาหารราคาสูงขึ้นหรือขาดแคลนได้ในอนาคต



บทที่ 2

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

การศึกษาการผลิตไขมันโดยเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นครั้งแรกในช่วงแรกของสงครามโลกครั้งที่ 1 เมื่อประเทศเยอรมันผลิตไขมันจาก *Endomyces* sp. และ *Fusarium* sp. เพื่อแก้ปัญหาไขมันในกระบวนการประกอบอาหารระยะสั้น แต่ในปัจจุบันปัญหาเรื่องราคาของแหล่งพลังงานสูงขึ้น ปัญหาเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม และแหล่งพลังงานปิโตรเลียมมีปริมาณลดลง การค้นคว้าหาแหล่งพลังงานทดแทนไบโอดีเซลที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น ซึ่งไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากไขมันพืช ไขมันสัตว์ และไขมันเหลือทิ้ง อย่างไรก็ตามการผลิตไบโอดีเซลจากไขมันพืชจะต้องใช้พลังงานและพื้นที่เพาะปลูกพืชกว้าง ทำให้ต้นทุนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลเพิ่มขึ้น 70-85% ในขณะเดียวกันเมื่อผลิตไบโอดีเซลจากไขมันสัตว์ก็มีต้นทุนการเลี้ยงสัตว์ซึ่งมีต้นทุนสูงเช่นเดียวกัน ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนการผลิตไขมัน จุลินทรีย์สะสมไขมันจึงได้รับความสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์มีช่วงชีวิตสั้น ใช้สารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงได้หลากหลายและราคาถูก ไม่ได้รับผลกระทบจากสภาพอากาศหรือฤดูกาล ใช้แรงงานน้อย และสามารถผลิตในระดับขยายส่วนได้ง่าย (Liang & Jiang, 2013)

2.1 จุลินทรีย์สะสมไขมัน (oleaginous microorganisms)

จุลินทรีย์สะสมไขมัน (oleaginous microorganism) หมายถึง จุลินทรีย์ที่สามารถสะสมไขมันได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์ (Meng et al., 2009) หรือเรียกว่า Single cell oils (SCOs) ซึ่งสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ ยีสต์ ฟังไจ แบคทีเรีย และสาหร่าย โดยที่เซลล์แบบยูคาริโอต เช่น ยีสต์ รา และสาหร่ายสามารถผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol; TAGs) ที่มีองค์ประกอบคล้ายกับไขมันจากพืช ส่วนเซลล์แบบโพรคาริโอต ได้แก่ แบคทีเรีย จะผลิตไขมันสะสมในเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษ จุลินทรีย์สะสมไขมันหลายชนิดสามารถสะสมไขมันในเซลล์ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน (tranesterification) (Liang & Jiang, 2013)

2.1.1 สาหร่ายสะสมไขมัน (oleaginous microalgae)

สาหร่ายสะสมไขมัน (oleaginous microalgae) หมายถึง สาหร่ายที่สามารถสะสมไขมันในเซลล์ได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบเฉลี่ยค่าไขมันสะสม 1-70% หรืออาจสูงถึง 90% ของน้ำหนักเซลล์แห้งในบางสภาวะของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 1) แต่โดยปกติจะพบสาหร่ายสะสม

ไขมันในเซลล์ประมาณ 20-50% สำหรับเซลล์เดี่ยววิชั้น Chlorophyta โดยเฉพาะ *Chlorella* sp. มีปริมาณไขมันสะสมต่อน้ำหนักเซลล์ (lipid content) สูง เพาะเลี้ยงง่าย สามารถประยุกต์ใช้ในการผลิตไขมันในระดับอุตสาหกรรมได้ ปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ในระดับขยายส่วนเพื่อการผลิตไบโอดีเซล โดยสามารถผลิตไขมันสะสมในเซลล์ได้ถึง 55% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในสภาวะ Heterotrophic ซึ่งมากกว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ Autotrophic ถึง 4 เท่า (Miao & WU, 2004) นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการ Nation Renewable Energy Laboratory (NREL) ประเทศอังกฤษ สามารถพัฒนาโครงการ Engineering Cyclotella ที่สามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายระดับห้องปฏิบัติการให้สะสมไขมันในเซลล์ได้ถึง 60% และสภาวะเปิดได้ถึง 40% ของน้ำหนักเซลล์ ซึ่งปกติสาหร่ายจะสะสมไขมันได้เซลล์เพียง 5-20% เท่านั้น (Dünahay, Jarvis, Zeiler, Roessler, & Brown, 1992)

ตารางที่ 1 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ (lipid content) ของสาหร่ายบางชนิด

ชนิดสาหร่าย	สภาวะการเลี้ยง	ปริมาณไขมัน (%, w/w)	อ้างอิง
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Phototrophic	11.50	Araujo et al. (2016)
<i>Chaetoceros mulleri</i>	Phototrophic	11.67	Araujo et al. (2016)
Marine <i>Chlorella</i> sp.	Phototrophic	21.74	Srinuanpan, Cheirsilp, Kitcha, & Prasertsan (2017)
<i>Chlorella</i> sp.	Phototrophic	43.20	Sengmee, Cheirsilp, Suksaroge, & Prasertsan (2017)
<i>Chlorella</i> sp. L1	Phototrophic	33.03	He, Yang, Wu, & Hu (2015)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Phototrophic	40.00	Espinosa-Gonzalez, Asomaning, Mussone, & Bressler (2014)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Phototrophic	52.49	Araujo et al. (2016)
<i>Dunaliella</i> sp.	Phototrophic	30.12	Araujo et al. (2016)
<i>Isochrysis</i> sp.	Phototrophic	21.25	Araujo et al. (2016)

ตารางที่ 1 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ (lipid content) ของสาหร่ายบางชนิด (ต่อ)

ชนิดสาหร่าย	สภาวะการเลี้ยง	ปริมาณไขมัน (%, w/w)	อ้างอิง
<i>Isochrysis zhangjiangensis</i>	Phototrophic	53.00	Feng, Chen, Xue, & Zhang (2011)
<i>Monoraphidium dybowskii</i> Y2	Phototrophic	32.76	He, Yang, & Hu (2016)
<i>Monoraphidium</i> sp. QLY-1	Phototrophic	48.54	Zhao et al. (2016)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Phototrophic	44.70	Thawechai, Cheirsilp, Louhasakul, Boonsawang, & Prasertsan (2016)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Phototrophic	43.04	Guo et al. (2014)
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Phototrophic	62.10	Li et al. (2016)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Phototrophic		Araujo, Matos, Gonçalves, Fernandes, & Farias (2011)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Phototrophic	23.36	Srinuanpan et al. (2017)
<i>Scenedesmus obtusus</i> XJ-15	Phototrophic	47.70	Xia, Ge, Zhou, Zhang, & Hu (2013)
<i>Tetraselmis chui</i>	Phototrophic	17.25	Araujo et al. (2011)
<i>Tetraselmis tetrahele</i>	Phototrophic	29.18	Araujo et al. (2011)
<i>Tribonema minus</i>	Phototrophic	61.78	Hui, Wenjun, Wentao, Lili, & Tianzhong (2016)
<i>Tribonema</i> sp.	Phototrophic	49.55	Guo et al. (2014)

2.1.2 ยีสต์และราสะสมไขมัน (oleaginous yeast and mold)

มีรายงานเกี่ยวกับยีสต์สะสมไขมันหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Candida pseudolambica*, *Cystobasidium oligophagum*, *Issatchenkia occidentalis*, *Rhodospiridium*

kratochvilovae, *Trichosporon* sp. และ *Yarrowia lipolytica* โดยสามารถสะสมไขมันในเซลล์ได้สูงในสภาวะการเพาะเลี้ยงบางสภาวะ (ตารางที่ 2) และมีองค์ประกอบของไขมันแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของยีสต์ นอกจากนี้ยังพบราบางสายพันธุ์ที่สะสมไขมันในเซลล์ได้สูงเช่นกัน ได้แก่ *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Mortierella isabelline*, *Mucor circinelloides* และ *Trichoderma reesei* แต่ถึงแม้ว่าจะสามารถสะสมไขมันในเซลล์ได้สูง (ตารางที่ 2) แต่ไขมันที่ผลิตได้เป็นไขมันชนิดพิเศษ เช่น DHA, GLA, EPA และ ARA ซึ่งพบรายงานน้อยในการนำไขมันจากรามาผลิตเป็นไบโอดีเซล

ตารางที่ 2 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ (lipid content) ของยีสต์และราบางชนิด

ชนิดยีสต์และรา	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณไขมัน (%, w/w)	อ้างอิง
ยีสต์			
<i>Candida pseudolambica</i>	Livestock wastewater	35.30	Chung, Lee, & Han ๖ (2016)
<i>Cystobasidium oligophagum</i> JRC1	Glucose	39.44	Vyas & Chhabra (2017)
	Carboxymethylcellulose	36.46	
	Glycerol	42.04	
	Starch	41.54	
	Xylose	36.24	
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	Livestock wastewater	28.90	Chung et al. (2016)
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> HIMPA1	Glucose and phenol	64.92	Patel, Sartaj, Arora, Pruthi, & Pruthi (2017)
<i>Trichosporon</i> sp.	Glucose	59.61	Brar, Sarma, Aslam,
	Glycerol	56.02	Polikarpov, &
	Sugarcane bagasse hydrolysate	40.50	Chadha (2017)

ตารางที่ 2 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ (lipid content) ของยีสต์และราบางชนิด (ต่อ)

ชนิดยีสต์และรา	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณไขมัน (%, w/w)	อ้างอิง
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Food waste leachates	49.00	Johnravindar, Karthikeyan, Selvam, Murugesan, & Wong (2018)
รา			
<i>Alternaria</i> sp.	Glucose	36.40-49.10	Dey, Banerjee, & Maiti (2011)
<i>Colletotrichum</i> sp.	Glucose	40.10-58.10	Dey et al. (2011)
<i>Mortierella isabellina</i> ATCC42613	Corn stover hydrolysate	30.00	Ruan, Zanotti, Archer, Liao, & Liu (2014)
<i>Mucor circinelloides</i> MTCC1297	Wastewater	22.11	Ruan, Zanotti, Archer, Liao, & Liu (2014)
<i>Trichoderma reesei</i> NCIM992	Wastewater	9.82	Ruan, Zanotti, Archer, Liao, Liu, et al. (2014)

2.1.3 แบคทีเรียสะสมไขมัน (oleaginous bacteria)

แบคทีเรียมีการสะสมไขมันในสภาวะจำเพาะ และมีองค์ประกอบของไขมันแตกต่างจากไขมันที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ส่วนมากแบคทีเรียจะผลิตไขมันเชิงประกอบ (complex lipid) และมีโมเลกุลสายพังก์ที่สามารถผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งเป็นไขมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus erythropolis* และ *Rhodococcus rhodochrous* (ตารางที่ 3) นอกจากนี้มีรายงานว่า *Gordonia* sp. และ *Rhodococcus opacus* สามารถเจริญเติบโตในบางสภาวะที่ให้เซลล์ชีวมวลเพียง 1.88 กรัมต่อลิตร แต่สะสมไขมันในเซลล์สูงถึง 80% ของน้ำหนักเซลล์ (Gouda, Omar, & Aouad, 2008) เนื่องจากมีการศึกษากระบวนการผลิตไขมันสะสมในเซลล์ของแบคทีเรียอย่างกว้างขวาง ทำให้เข้าใจถึงระดับการ

ควบคุมกระบวนการผลิตระดับยีน ดังนั้นจึงใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงพันธุ์ของแบคทีเรียให้สามารถสะสมไขมันในเซลล์ได้สูงขึ้น

ตารางที่ 3 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ (lipid content) ของแบคทีเรียบางชนิด

ชนิดแบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณไขมัน (%, w/w)	อ้างอิง
<i>Bacillus subtilis</i> HB1310	cotton stalk hydrolysate	39.80	Zhang, Li, & Xia (2014)
<i>Rhodococcus opacus</i> DSM 1069	Pine organosolv pretreatment effluent	26.99	Wells, Wei, & Ragauskas (2015)
<i>Rhodococcus opacus</i> DSM 43205	Biomass gasification wastewater	62.80	Goswami, Tejas Nambodiri, Vinoth Kumar, Pakshirajan, & Pugazhenth (2017)
<i>Rhodococcus opacus</i> PWD4	Glucose	16.24-67.29	Cortes & de Carvalho (2015)
<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> DCL14	Glucose	34.81-80.25	Cortes & de Carvalho (2015)
<i>Rhodococcus</i> <i>rhodochrous</i>	Glucose, HBA & VA	>40.00	Shields-Menard et al. (2017)
<i>Rhodococcus</i> <i>rhodochrous</i>	Glucose & phenol	35.00	Shields-Menard et al. (2017)

หมายเหตุ : HBA คือ 4-hydroxybenzoic acid

VA คือ vanillic acid

2.2 ยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeast)

ยีสต์ (yeast) หมายถึงราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัว (fission) เนื่องจากเป็นเซลล์เดี่ยวจึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า เนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นผิวต่อ

ปริมาณสูงกว่า ยีสต์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์อาศัยอยู่บนสารอินทรีย์ที่ตายแล้ว หลายชนิดพบในดิน ชนิดของยีสต์ในดินสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่ของเชื้อ ความสามารถที่จะอยู่รอดในธรรมชาติ องค์ประกอบของดิน อุณหภูมิ แสงแดด ความชื้น และปัจจัยอื่นๆ แต่แหล่งที่สามารถพบยีสต์ได้ปริมาณสูง คือ แหล่งที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมักจะปนลงไปเป็นอาหาร เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียได้

ยีสต์เป็นเซลล์แบบยูคาริโอต โดยทั่วไปขนาดของเซลล์ยีสต์ใหญ่กว่าแบคทีเรีย มีขนาดตั้งแต่ 1-5 ไมโครเมตร และความยาว 5-30 ไมโครเมตร หรือมากกว่า มักมีรูปไข่ แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวและบางชนิดเป็นทรงกลม ยีสต์แต่ละชนิดมีรูปร่างโดยเฉพาะ แม้จะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังคงมีความแตกต่างที่ขนาดและรูปร่างของแต่ละเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ & ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

ในปัจจุบันการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สองจากมวลชีวภาพที่ไม่ใช่อาหาร (non-food biomass) ได้รับความสนใจจากนักวิจัยและอุตสาหกรรมทั่วโลกเพื่อรองรับความต้องการการใช้พลังงาน ไบโอดีเซลคืออัลคิลเอส-เทอร์ของกรดไขมัน (Fatty Acid Alkyl Esters (FAEs)) ที่ได้จากปฏิกิริยา ทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างแอลกอฮอล์กับไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols (TAGs)) ไตรเอซิลกลีเซอรอลพบมากในรูปของไขมันสะสมของพืชน้ำมันและไขมันสัตว์ที่เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์จึงเป็นข้อจำกัด (Galafassi et al., 2012) การผลิตน้ำมันและไขมัน หรือไขมันจากเซลล์เดี่ยว (single cell oils) ซึ่งไขมันที่สะสมในเซลล์จึงได้รับความสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะยีสต์สะสมไขมันซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดี่ยวที่ทราบกลไกทางชีวเคมีในการสร้างไขมันเป็นอย่างดีแล้ว โดยสามารถผลิตไขมันที่มีองค์ประกอบของไขมันประมาณ 95% เป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และยังพบฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สฟิงโกลิพิด (sphingolipids) และสเตียรอยด์ (steroid compound) ที่มีความคล้ายกับน้ำมันจากพืช ทำให้มีศักยภาพในการนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซลได้เช่นเดียวกันกับน้ำมันพืช โดยผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) นอกจากนี้การผลิตไขมันจากยีสต์ยังมีข้อได้เปรียบกว่าการปลูกพืชน้ำมัน คือ ยีสต์มีช่วงชีวิตสั้นจึงเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เร็ว ใช้แรงงานน้อย ไม่ได้รับผลกระทบจากสภาพอากาศหรือฤดูกาล และพัฒนาการผลิตในระดับขยายส่วนได้ง่าย (Chisti, 2008) กรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมัน (oleaginous yeasts) ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันที่มีองค์ประกอบคล้ายกับองค์ประกอบของน้ำมันจากพืช โดยกรดไขมันเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon compounds) ซึ่งประกอบด้วยธาตุคาร์บอนต่อกันเป็นโซ่ยาวและมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ต่อที่ปลายข้างหนึ่งของโมเลกุล กรดไขมันหลักที่พบในยีสต์และราสะสมไขมันส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) ประกอบด้วยกรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) กรดลิโนเลอิก (linoleic acid; C18:2) และยังพบกรดปาล์มมาติก (palmitic

acid; C16:0) หรือกรดปาล์มมิโตเลอิก (palmitoleic acid; C16:1) (Meng et al., 2009) ดังแสดงในตารางที่ 4 ยีสต์สะสมไขมันส่วนมากจะสะสมไขมันภายในเซลล์ (intracellular lipid) ในรูปของหยดน้ำมัน (oil droplet)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของกรดไขมันจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด

จุลินทรีย์	องค์ประกอบไขมัน (% , น้ำหนักต่อไขมันทั้งหมด)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
สาหร่าย	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
ยีสต์	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
รา	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
แบคทีเรีย	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-

ที่มา: Meng et al. (2009)

ปริมาณและองค์ประกอบของยีสต์สะสมไขมันแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกันทำให้มีคุณสมบัติที่สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีได้ ซึ่งคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซลจะมีคุณภาพดีหรือไม่ดีนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและปริมาณของกรดไขมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นน้ำมัน ไบโอดีเซล รวมถึงขั้นตอนและกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลด้วย ไขมัน (lipid) คือ สารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยธาตุหลัก คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน บางครั้งอาจมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสประกอบด้วย และเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไม่มีขั้ว (non-polar) เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform) อีเทอร์ (ether) ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) เบนซิล (benzene) และเฮกเซน (hexane) เป็นต้น และตัวทำละลายชนิดที่มีขั้วน้อย เช่น แอลกอฮอล์ อะซิโตน เป็นต้น ในโมเลกุลของไขมันจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีลักษณะไม่มีขั้ว มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) อยู่ในโครงสร้างไขมันบางชนิดจะมีหมู่ที่มีขั้วซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilicity) ต่อกับส่วนไม่มีขั้ว ทำให้สมบัติไขมันนั้นมีลักษณะเป็นแอมฟิฟิลล์ (amphiphile or amphipathic molecule) มีการจำแนกชนิดของไขมันออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (รัตนภรณ์ ลีสิงห์, 2551) คือ

1) ไขมันธรรมดา (simple lipids) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ แบ่งออกได้ดังนี้ ไขมันแท้ (true fats) และขี้ผึ้ง (waxes) ไขมันแท้ประกอบด้วยกรดไขมันกับกลี

เซอร์อล เมื่ออยู่ในสภาวะของเหลวที่อุณหภูมิห้องเรียกว่าน้ำมัน (oil) ส่วนแข็งประกอบด้วยกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ที่ไม่ใช่กลีเซอร์อล มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

2) ไขมันเชิงประกอบ (compound lipids) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และมีสารอื่นๆ รวมอยู่ด้วย ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ไกลโคลิพิด (glycolipids) และไลโปโปรตีน (lipoprotein)




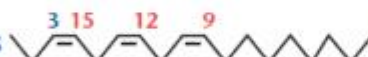


3) อนุพันธ์ไขมัน (derived lipids) เป็นสารประกอบที่ได้จากการเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของไขมันธรรมชาติและไขมันเชิงประกอบ ได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอร์อล โมโนกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ สเตอริรอยด์ คลอเรสเตอรอล คาร์ทีนอยด์ เป็นต้น

2.2.1 องค์ประกอบของไขมัน (lipid components) ในยีสต์ (Ratray, Schibeci, & Kidby, 1975)

2.2.1.1 กรดไขมัน (fatty acids)

กรดไขมันเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon compounds) ซึ่งประกอบด้วยธาตุคาร์บอนต่อกันเป็นโซ่ยาวและมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ต่อที่ปลายข้างหนึ่งของโมเลกุลซึ่งเป็นตัวชี้คุณสมบัติของกรดอินทรีย์ (ภาพที่ 1) องค์ประกอบไขมันในเซลล์ยีสต์พบเป็นกรดไขมันประมาณ 70-90% เช่น *Candida lipolytica* และ *Hansenula valbyensis* พบกรดไขมัน 40% ของไขมันที่สกัดได้จากเซลล์ทั้งหมด ยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีการสะสมไขมันในเซลล์ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันแตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 5) แต่โดยทั่วไปกรดไขมันหลักในยีสต์มีลักษณะเป็นโซ่ตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม (C₁₆ และ C₁₈) ซึ่งส่วนมากเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะกรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) นอกจากนี้ยังพบกรดลิโนเลอิก (linoleic acid; C18:2) และกรดลิโนเลนิก (linolenic; C18:3) ในยีสต์บางสายพันธุ์

พจนานุกรมศัพท์ชีวเว

ω -characteristics	Methyl end	Carboxyl end	Saturation	Δ -characteristics
Stearic 18:0		COOH	Saturate	18:0
Oleic 18:1, ω -9		COOH	Monoene	18:1 Δ 9
Linoleic 18:2, ω -6		COOH	Polyene	18:2 Δ 9,12
α -Linolenic 18:3, ω -3		COOH	Polyene	18:3 Δ 9,12,15
EPA 20:5, ω -3		COOH	Polyene	20:5 Δ 5,8,11,14,17
DHA 22:6, ω -3		COOH	Polyene	20:6 Δ 4,7,10,13,16,19

ภาพที่ 1 โครงสร้างของกรดไขมันบางชนิด
(Rustan & Drevon, 2005)

ตารางที่ 5 ปริมาณกรดไขมันในยีสต์บางสายพันธุ์

ยีสต์	ชนิดกรดไขมัน (% น้ำหนักต่อไขมันทั้งหมด)						อ้างอิง
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
<i>Cryptococcus curvatus</i>	32	1.0	8.0	48	9.0	-	Sankh, Thiru, Saran, & Rangaswamy (2013)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	23	0.9	16.7	39.6	15.2	0.66	(Liang, Cui, Trushenski, & Blackburn (2010)
<i>Candida lipolytica</i>	21.6	5.2	27.1	19.0	12.0	-	Karatay & Dönmez (2010)
<i>Candida tropicalis</i>	29.7	5.0	56.2	2.3	-	-	Karatay & Dönmez (2010)

ตารางที่ 5 ปริมาณกรดไขมันในยีสต์บางสายพันธุ์ (ต่อ)

ยีสต์	ชนิดกรดไขมัน (% น้ำหนักต่อไขมันทั้งหมด)						อ้างอิง
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
<i>Pichia kudriavzevii</i>	29.3	1.0	8.89	41.9	9.22	-	Sankh et al. (2013)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	26.2	-	37.3	22.3	6.5	-	Karatay & Dönmez (2010)
<i>Trichosporon fermentans</i>	27.5	5.8	54.2	10.1	-	-	Huang, Wu, Li, & Zong (2012)

2.2.1.2 ไฮโดรคาร์บอนและสเตอรอล (hydrocarbons and sterols)

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนคือสารที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น โมเลกุลของสารไฮโดรคาร์บอนที่เล็กที่สุดประกอบด้วยธาตุคาร์บอนเพียงหนึ่งอะตอม เมื่อจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้น อาจพบโครงสร้างทั้งแบบเป็นโซ่ตรงหรือมีการแตกกิ่ง สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่พบในเซลล์ยีสต์อาจพบสายโซ่ของธาตุคาร์บอนยาวมากกว่า 40 อะตอม เช่น พบจำนวนคาร์บอน 10-31 อะตอม (C₁₀-C₃₁) ในยีสต์ *Saccharomyces oviformis* และ *S. ludwigii*

สเตอรอยด์เป็นไขมันที่มีโครงสร้างเป็นรูปวงแหวน Perhydrocyclopentanophenanthrene ซึ่งเป็นเหตุทำให้สเตอรอยด์มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์ สเตอรอลที่พบในเซลล์มีปริมาณ 0.03-4.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือ <1-10% ของไขมันทั้งหมดในเซลล์ ยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* พบสเตอรอลจำนวนมากในเซลล์ โดยเฉพาะเออร์โกสเตอรอลเป็นสเตอรอลที่พบได้มากในยีสต์ *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* และ *Candida albican* ที่พบมากถึง 90% ของสเตอรอลทั้งหมด

2.2.1.3 กลีเซอโรฟอสโฟลิพิด (glycerophospholipids)

กลีเซอโรฟอสโฟลิพิด หรือฟอสโฟลิพิด (phospholipid) หรือฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride) หรือกลีเซอรอลฟอสฟาไทด์ (glycerol phosphatide) เป็นเอสเทอร์ระหว่างกรดฟอสฟริก (H₃PO₄) กับหมู่ไฮดรอกซิลหนึ่งของหมู่ของกลีเซอรอล เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เซลล์ยีสต์ส่วนมากจะมีฟอสโฟลิพิด 3.0-7.0% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยจะพบฟอสโฟฟาติดีลคอลลีน (phosphatidyl choline) 35-55% ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidyl ethanolamine) 20-32% ฟอสฟาติดีลอินโนซิทอล (phosphatidyl inositol)

9-22% ฟอสฟาติดีลเซอริน (phosphatidyl serine) 4-18% และฟอสโฟลิพิดอื่นๆ <10% ของฟอสโฟลิพิดทั้งหมด

กลีเซอโรฟอสโฟลิพิดมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำเป็นกรดไขมันสองสายต่ออยู่กับกลีเซอรอล ส่วนที่ชอบน้ำเกิดจากหมู่ฟอสเฟตจับกับหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอล และพบมากที่ผนังเซลล์ยีสต์ เช่น พบ 15 และ 39% ของไขมันทั้งหมดในยีสต์ *Trigonopsis variabilis* และ *Candida albican* ตามลำดับ

2.2.1.4 สฟิงโกลิพิด (sphingolipids)

สฟิงโกลิพิดเป็นการรวมตัวของสฟิงโกซายน์ (sphingosine) กับกรดไขมันและหมู่ฟอสเฟต เป็นไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเยื่อหุ้ม และไม่มีกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบ พบจำนวนคาร์บอน 18 และ 20 อะตอม (C_{18} และ C_{20}) ในอัตราส่วน 9:1 มีปริมาณ 2-3% ของไขมันทั้งหมดที่พบในยีสต์ *Candida intermedia* นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบของสฟิงโกลิพิด เช่น สฟิงโกซายน์ (sphingosine) ไดไฮโดรสฟิงโกซายน์ (dihydrosphingosines) และไฟโตสฟิงโกซายน์ (phytosphingosines) ที่พบในยีสต์ *Torulopsis utilis*, *Candida utilis*, และ *S. cerevisiae* เป็นต้น บทบาทหน้าที่ของสฟิงโกลิพิดในยีสต์ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่มีรายงานว่าการที่ไฟโตสฟิงโกซายน์เกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) ด้วยหมู่แอซีทิล (acetyl group) บนเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ *Hansenula ciferrii* ทำให้ยีสต์มีแนวโน้มในการสร้างเพลลิเคิล (pellicle) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

2.2.1.5 ไกลโคลิพิด (glycolipids)

ไกลโคลิพิดประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อไปกับไขมันมีหน้าที่ให้พลังงาน และเป็นตัวกำหนดเครื่องหมายเพื่อการจดจำของเซลล์ ปรากฏอยู่ที่จุดเชื่อมต่อระหว่างฟอสโฟลิพิดกับไฮดรอกซิลของคาร์โบไฮเดรต ไกลโคลิพิดมีโครงสร้างจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นจำนวนคี่ และมากกว่า 18 อะตอม ($>C_{18}$) ไกลโคลิพิดที่พบในเซลล์ยีสต์ ได้แก่ สเตอรอลไกลโคไซด์ (sterol glycoside) ซัลโฟลิพิด (sulfolipid) และเอซิลกลูโคส (acyl glucose) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบเอซิลกลูโคสปริมาณมากภายในเซลล์ยีสต์ เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส ซึ่งเป็นกระบวนการจัดเก็บและขนส่งกลูโคสภายในเซลล์ยีสต์

2.3 กระบวนการผลิตไขมันในยีสต์สะสมไขมัน

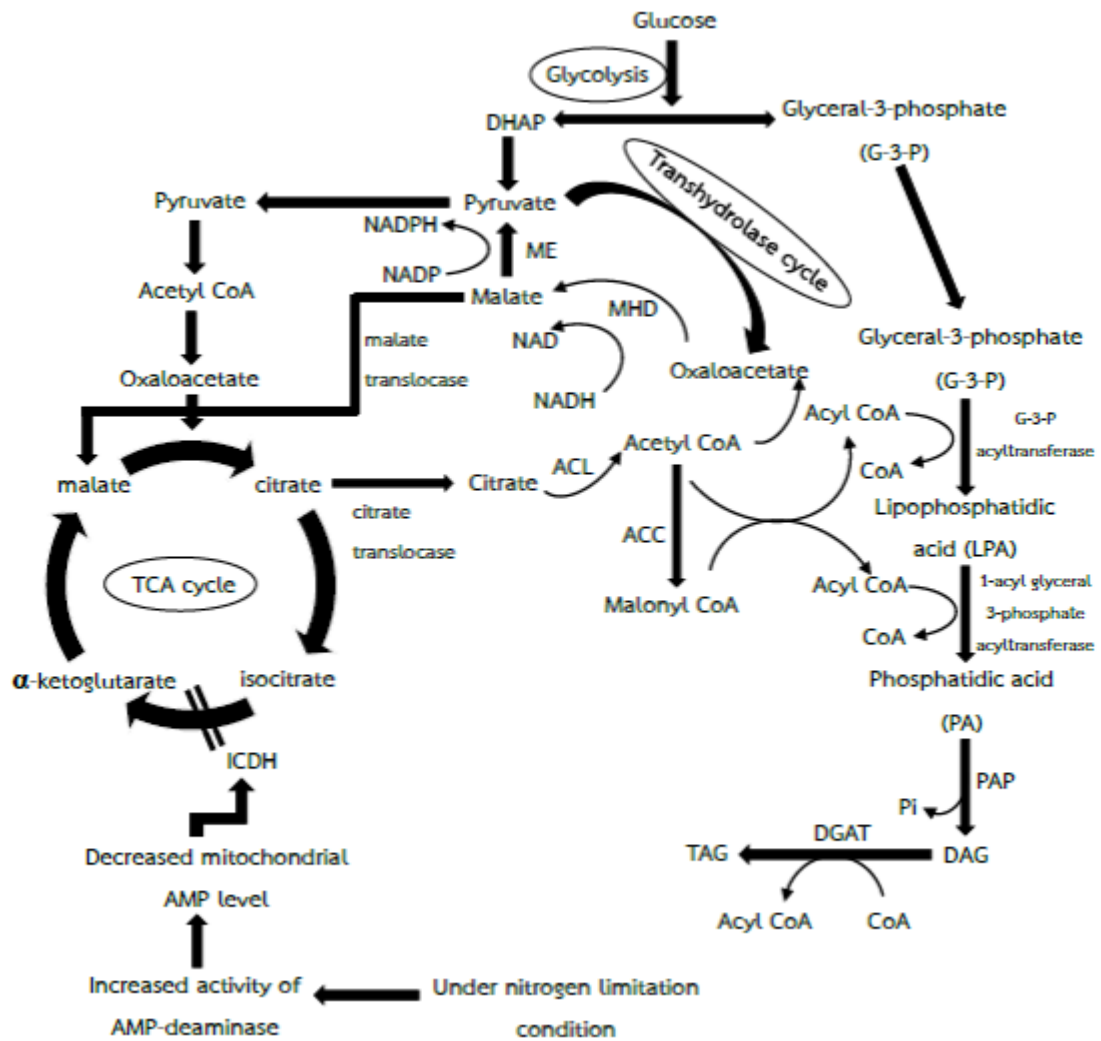
จุลินทรีย์จะสะสมไขมันเมื่อมีการเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มีมากเกินไปและมีจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถสะสมไขมันและผลิตไขมันได้ในปริมาณมากต้องสามารถเข้าสู่การสังเคราะห์ไขมันได้ทันที โดยจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ไขมันต้องมี

คุณสมบัติดังนี้ คือ มีความสามารถในการผลิตอะซิติลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl-CoA) ได้อย่างต่อเนื่องภายในเซลล์ ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดไขมัน และมีความสามารถในการผลิต NADPH มากเพียงพอเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน การสังเคราะห์อะซิติลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl-CoA) ในจุลินทรีย์สะสมไขมันจะเกิดขึ้นเมื่อมีเอนไซม์ ATP: citrate lyase (ACL) (Ratledge, 2004)

เชื้อจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันและได้รับความสนใจในการศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาการผลิตไขมันมากขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์มีความหลากหลายของสายพันธุ์และสามารถใช้สารตั้งต้นราคาถูกเพื่อการเจริญและผลิตไขมัน นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนากระบวนการผลิตไขมันในระดับขยายส่วนได้ง่ายอีกด้วย ในสภาวะการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แบคทีเรียจะย่อยสลายคาร์บอนไปเป็นพอลิแซคคาไรด์และกรดไขมันที่อยู่ในรูป polyhydroxyalkanoate ในขณะที่ยีสต์จะสะสมแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป เช่น ไกลโคเจนและไขมันที่อยู่ในรูปของ ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol; TAGs) ยีสต์มีลักษณะจำเพาะที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน แต่จะพบการสะสมไขมันสูงในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไปหรือมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องด้วยเช่นกัน เช่น อุณหภูมิ และ pH

ยีสต์สะสมไขมันสามารถแบ่งระยะการเจริญออกได้ 3 ระยะ ได้แก่ (1) ระยะเพิ่มจำนวนเซลล์ (exponential growth phase) โดยที่ยีสต์จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในระยะนี้ (2) ระยะการสะสมไขมัน (lipid accumulation phase) เป็นระยะที่พบการสะสมไขมันสูงที่สุด ในขณะที่พบการเจริญต่ำเนื่องจากแหล่งอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ เป็นต้น มีปริมาณจำกัด (3) ระยะคงที่ (stationary phase หรือ late accumulation phase) เป็นระยะที่พบการสะสมไขมันในปริมาณน้อย เมื่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนถูกใช้ไปหมดจะพบ adenosine monophosphate (AMP) ภายในเซลล์ลดลง เนื่องจากเอนไซม์ adenosine monophosphate deaminase ถูกกระตุ้นให้ทำงาน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในยีสต์สะสมไขมันแต่ไม่พบในยีสต์ที่ไม่มีความสามารถในการผลิตไขมัน เอนไซม์จะเปลี่ยน AMP กลายเป็น inosine 5'-monophosphate และ ammonium เมื่อ AMP ในเซลล์ลดลงมีผลทำให้เอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ถูกยับยั้งไม่สามารถย่อยสลาย isocitrate ผ่านกระบวนการ tricarboxylic acid cycle (TCA) ทำให้ isocitrate สะสมในรูป citrate ในยีสต์สะสมไขมันจะมีการผลิต phosphatidic acid (PA) จาก glycerol-3-phosphate (G-3-P) หรือ dihydroxyacetone phosphate (DHAP) ขึ้นกับชนิดของแหล่งคาร์บอน จากนั้นเอนไซม์ phosphatidate phosphatase (PAP) จะสลาย PA ไปเป็น Diacylglycerol (DAG) ผ่านกระบวนการ dephosphorylation reaction (ภาพที่ 2) สุดท้าย DAG จะถูกเปลี่ยนไปเป็นของไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) ด้วยเอนไซม์ diacylglycerol acyltransferases ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์และปริมาณ acetyl CoA กรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมันมีความ

หลากหลายขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ แต่จะพบชนิดกรดไขมันหลักๆ ได้แก่ myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2) และ linolenic acid (C18:3) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับไขมันที่ผลิตได้จากพืชและสาหร่าย



ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไตรเอซิลกลีเซอรอล
 สละสมในเซลล์ของยีสต์สะสมไขมัน

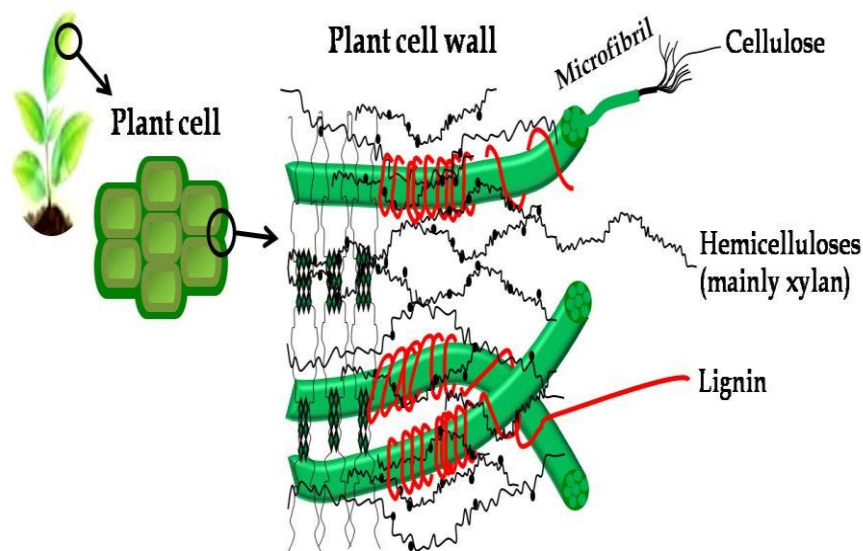
(Patel, Arora, Sartaj, Pruthi, & Pruthi, 2016)

2.4 ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose)

ปัจจุบันลิกโนเซลลูโลสเป็นสารประกอบชีวมวลที่มีปริมาณมากที่สุดในโลก พบมากในผนังเซลล์ของพืช ได้แก่ เศษวัสดุเหลือทิ้งจากไม้ ทั้งไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน เศษวัสดุจากการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด เส้นใยข้าวโพด ชานอ้อย แกลบ และพวงฟางข้าว ขยะจากระบวนการแปรรูปอาหารและจากบ้านเรือน รวมถึงมูลสัตว์ต่างๆ ซึ่งลิกโนเซลลูโลสนี้เมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพจะได้น้ำตาลออกมาที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ (รัชพล พะวงศรีรัตน์, 2558)

2.4.1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (ภาพที่ 3) ในอัตราส่วนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทของวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ตารางที่ 6) โดยทั่วไปพบเซลลูโลส 40-60% เฮมิเซลลูโลส 20-30% และลิกนิน 15-30%



ภาพที่ 3 โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของลิกโนเซลลูโลส

(Doshi & Karolia, 2016)

2.4.1.1 เซลลูโลส (cellulose)

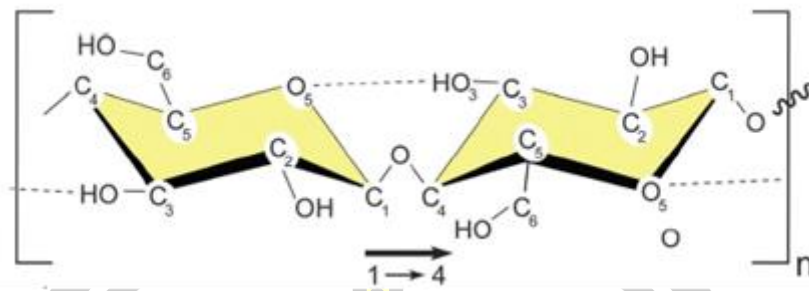
เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่พบมากในวัสดุประเภทพอลิโนเซลลูโลส โดยพบในส่วนของผนังเซลล์ของพืช อยู่ร่วมกับเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ปริมาณที่พบแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืช เช่น เนื้อไม้พบประมาณ 40-50% และเส้นใยฝ้ายพบประมาณ 98%

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	ปริมาณเซลลูโลส (%)	ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (%)	ปริมาณลิกนิน (%)
ไม้เนื้อแข็ง	40-55	24-40	18-25
ไม้เนื้ออ่อน	45-50	25-35	25-35
เปลือกถั่ว	25-30	25-30	30-40
ซังข้าวโพด	45	35	15
หญ้า	25-40	35-50	10-30
ฟางข้าว	30	50	15
ใบไม้	15-20	80-85	0
ใยเมล็ดฝ้าย	80-95	5-20	0
หญ้าคอสทอล เบอมีวตา	25	35.7	6.4
หญ้าสวิช	45	31.4	12.0

ที่มา: รัชพล พะวงศรีรัตน์ (2558)

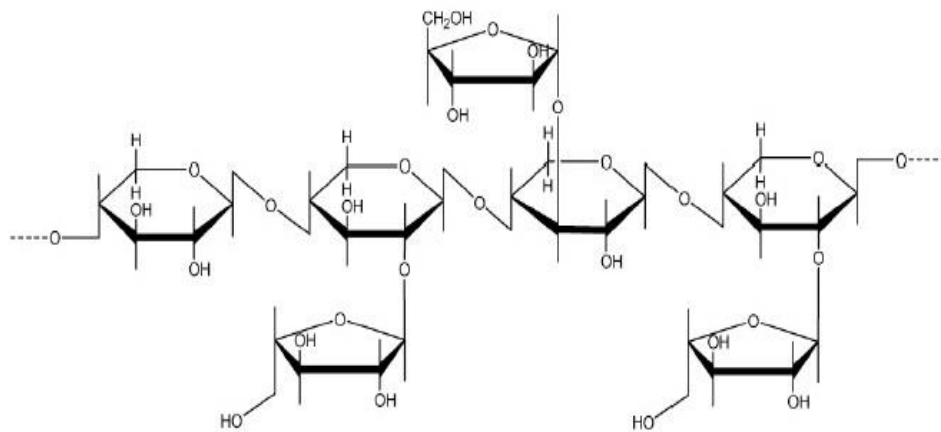
เซลลูโลสเป็นโฮโมโพลิเมอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ เบต้า-D-กลูโคไพราโนส (β -D-glucopyranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic bond) เกิดเป็นโพลิเมอร์กลูแคน (glucan) มีความยาวตามธรรมชาติประมาณ 10,000 หน่วย ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยทั่วไปในธรรมชาติพบเซลลูโลส 2 แบบ คือ Crystalline cellulose และ Amorphous cellulose โดยส่วนของ Crystalline cellulose จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ยากกว่า Amorphous สำหรับโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส แสดงในภาพที่



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสที่ประกอบโมเลกุลของกลูโคส
ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก
(Moon, Martini, Nairn, Simonsen, & Youngblood, 2011)

2.4.1.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

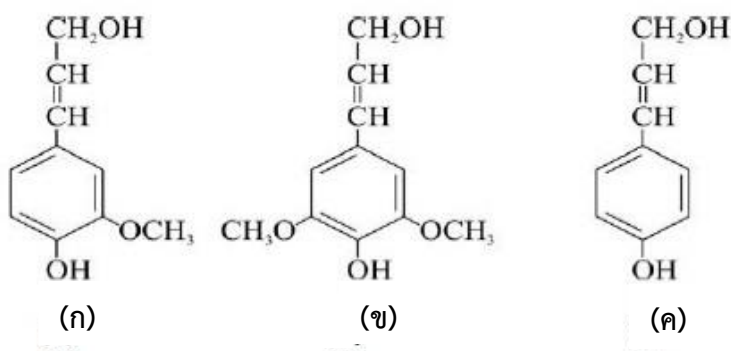
เฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็น เฮเทอโรโพลิเมอร์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ หลายชนิดผสมกัน เช่น กลูโคส แมนโนส ไซโลส และอะราบินโนส ซึ่งพบอยู่ในรูปโพลิเมอร์ไซแลน แมนแนน กาแลกแตน และอะราบินแนน มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 200 หน่วย โดยในพอลิเมอร์ไวแลน ดี-ไซโลสมีปริมาณมากที่สุดคือ 85-93% ส่วนองค์ประกอบอื่น เช่น กลูโคส กรดกลูคิวโรนิก กรดกาแลคตูโรนิก จะพบปริมาณน้อย โดยไซโลสที่พบจะเชื่อมด้วยพันธะเบต้า 1,4 ไกลโคซิดิก สำหรับโครงสร้างทางเคมีของไซแลน แสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างโมเลกุลของไซแลน
(Bastawde, 1992)

2.4.1.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนินเป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่พบในส่วนผนังเซลล์ของพืช พบในปริมาณที่แตกต่างไปตามชนิดของพืชในธรรมชาติ ลิกนินเป็นส่วนป้องกันเซลล์ไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบ 3 มิติ ไม่แตกผลึก ประกอบด้วยสารประกอบอะโรมาติก 3 ชนิด ประกอบด้วย tran-p-coumaryl alcohol, trans-coniferyl alcohol และ trans-p-sinapyl alcohol นอกจากนี้โมเลกุลของลิกนินยังเชื่อมต่อกับสารประกอบอะโรมาติกอื่นอีกมากมาย เช่น Vanillin และ Syringaldehyde สูตรโครงสร้างของ tran-p-coumaryl alcohol, trans-coniferyl alcohol และ trans-p-sinapyl alcohol แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างของ (ก) trans-coniferyl alcohol (ข) trans-p-sinapyl alcohol
(ค) tran-p-coumaryl alcohol

(Eriksson, Blanchette, & Ander, 1990)

2.5 การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส (pretreatment method)

ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบจะกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านกายภาพคือทำให้ชั้นแมทริกซ์ของวัสดุลิกโนเซลลูโลสถูกทำลายซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์สามารถทำงานอย่างมีประสิทธิภาพส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำงานได้ง่ายขึ้น จุดประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบ คือ เป็นการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความพรุนความวัสดุสามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธีหลักๆ ดังนี้ (รัชพล พะวงศรีรัตน์, 2558)

2.5.1 วิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

2.5.1.1 การใช้แรงทางกล (mechanical comminution)

การทำให้ลิกโนเซลลูโลสมีขนาดเล็กลงสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น การบด หยาบ การหั่น การย่อย การทุบ การบด และการโม่ เป็นต้น การปรับสภาพด้วยวิธีนี้มีผลทำให้เกิด การลดผลึกและเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยามากขึ้น หลังวัตถุดิบผ่านการหั่นจะลดขนาดเหลือ ประมาณ 10-30 มิลลิเมตร และถ้าการโม่หรือบดจะมีขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร ซึ่งลักษณะและขนาด สุดท้ายของวัตถุดิบจะขึ้นกับแรงทางกลที่ใช้ เช่น ไม้เนื้อแข็งต้องใช้แรงทางกลมากกว่าของเหลือทิ้ง ทางการเกษตร เป็นต้น (Singh, Shukla, Tiwari, & Srivastava, 2014)

2.5.1.2 การไพโรไลซิส (pyrolysis)

การไพโรไลซิสเป็นวิธีการปรับสภาพโดยใช้ความร้อนสูงมากกว่า 300 องศาเซลเซียส ทำให้วัตถุดิบกลายเป็นแก๊สหรือผงถ่าน ที่สภาวะอุณหภูมิต่ำกว่านี้กระบวนการจะเกิดขึ้นได้ช้า และมีการระเหยจะต่ำ จากการวิจัยพบว่าการใช้อุณหภูมิมากไปหรือน้อยไปจะไม่เป็นผลดี จึงต้องมีการวิจัยที่เหมาะสม (Singh et al., 2014)

2.5.1.3 การใช้ความร้อน (thermal heat treatment)

เป็นการปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของเซลลูโลส ซึ่งโดยส่วนใหญ่ มักจะใช้อุณหภูมิมักกว่า 150-180 องศาเซลเซียส แต่ต้องทำให้วัสดุมีขนาดที่เล็กลงก่อนเข้าสู่ กระบวนการย่อยวัตถุดิบทางความร้อน (รัชพล พะวงค์รัตน์, 2558)

2.5.2 วิธีการทางชีวภาพ (biological pretreatment)

วิธีการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการทางชีวภาพที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เช่น เอนไซม์ เพอออกซิเดส (peroxidase) ที่ผลิตจาก White-rot fungi สามารถย่อยสลายพันธะทั้งในเซลลูโลส และลิกนินได้ อย่างมีประสิทธิภาพ (Singh et al., 2014) มีการใช้จุลินทรีย์ Brown-, White-, และ Soft-rot fungi ในการปรับสภาพวัตถุดิบ White-rot fungi อาทิเช่น *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* และ *Pleurotus ostreatus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการปรับสภาพด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (รัชพล พะวงค์รัตน์, 2558) ถึงแม้ว่าวิธีการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการทางชีวภาพจะเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แต่ในระดับอุตสาหกรรมยังเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ช้า บางครั้งใช้เวลา 10-14 วัน นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึง สภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ใช้พื้นที่มาก และมีราคาแพง ปัจจุบันจึงยังประยุกต์ใช้การปรับสภาพด้วยวิธีนี้น้อยในระดับอุตสาหกรรม

2.5.3 วิธีการทางเคมี (chemical pretreatment)

2.5.3.1 การทำปฏิกิริยากับโอโซน (ozonolysis)

โอโซนเป็นตัวออกซิแดนต์ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถทำให้เกิดการแตกตัวของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัสดุพวกฟางข้าวได้ วิธีนี้มีจุดเด่นคือ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเอาลิกนินออกได้ดี ไม่มีสารพิษที่จะไปยับยั้งการทำปฏิกิริยาในส่วนต่างๆ กระบวนการนี้สามารถทำได้ทั้งอุณหภูมิห้อง แต่ผลเสียของวิธีนี้คือค่าใช้จ่ายที่สูงมาก (รัชพล พะวงศรีรัตน์, 2558)

2.5.3.2 การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้ด่าง (alkali pretreatment)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต่างที่นิยมนำมาใช้ปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส (Singh et al., 2014) การย่อยสลายด้วยด่างจะไปเพิ่มการพองตัวของโมเลกุลที่ต่อสายพันธะภายในของโซลแลนในเฮมิเซลลูโลส ความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อทำการกำจัดสายโซ่ที่เชื่อมต่อกันใน การใช้ด่างในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีผลต่อวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส และผลของด่างที่ใช้ในกระบวนการแปลงสภาพจะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัสดุด้วย การใช้ด่างเจือจางในวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีผลทำให้เกิดการบวมภายในเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยา ทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส ลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ และสามารถแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนิน อย่างไรก็ตามการใช้ด่างเพื่อปรับสภาพมักจะไม่ค่อยมีผลต่อวัสดุพวกไม้เนื้ออ่อนเท่าไม้เนื้อแข็ง (รัชพล พะวงศรีรัตน์, 2558)

2.5.3.3 การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้กรด (acid pretreatment)

กระบวนการปรับสภาพโดยใช้กรดนั้นมีจุดประสงค์คือ เพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณที่สูงจากวัสดุชีวมวล ชนิดของกรดที่นำมาปรับสภาพมีมากมายหลายประเภท ได้แก่ กรดซัลฟิวริก ไฮโดรคลอริก ไนตริก หรือฟอสฟอริก เป็นต้น ในกระบวนการแปลงสภาพสามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและเจือจางเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการไฮโดรไลซิสในกระบวนการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส การใช้กรดเจือจางเป็นวิธีหนึ่งที่มีความสนใจในการศึกษากันมากและแพร่หลายที่สุด การใช้กรดเจือจางเพื่อปรับสภาพวัตถุดิบที่อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยใช้กรดซัลฟิวริกหรือกรดฟอสฟอริก มักจะถูกใช้สำหรับการเปลี่ยนวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลที่ละลายได้ ตามด้วยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อให้เกิดเป็นกลูโคส ในการใช้กรดเจือจางจะมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ (1) ปริมาณสารตั้งต้นน้อย (5-10% โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิสูง ($T > 433$ องศาเซลวิน) และ (2) ปริมาณสารตั้งต้นมาก (10-40% โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิต่ำ ($T < 433$ องศาเซลวิน) (รัชพล พะวงศรีรัตน์, 2558)

Hamelinck, Van Hooijdonk, & Faaij (2005) รายงานว่าการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสที่อุณหภูมิสูงและใช้เวลาน้อยจะมีผลทำให้พบปริมาณไซโลสสูงและการทำงานของเอนไซม์

สามารถทำงานได้ดีกว่า การใช้กรดเจือจางที่อุณหภูมิสูงพบว่า มีผลต่อการย่อยเซลลูโลสได้สูงขึ้น ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นและความเข้มข้นที่ใช้ โดยส่วนใหญ่ 80% และ 95% ของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลสสามารถได้คืนมาโดยการใช้กรดเจือจางในการปรับสภาพจากการใช้วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิที่ใช้เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดสารที่เป็นพิษ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (<160 องศาเซลเซียส) เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเฮมิเซลลูโลส ในขณะที่เดียวกันเมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 160 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อเซลลูโลสมากกว่า ซึ่งพบว่าจะมีการเกิดปริมาณน้ำตาลที่สูงและมีการสลายส่วนประกอบของลิกนินด้วย โดยทั่วไปแล้วการใช้กรดเจือจางผสมกับวัสดุชีวมวลและทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง 160-220 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาสั้น จะเกิดการไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสให้เป็นไซโลสและน้ำตาลตัวอื่น และจากนั้นจะมีการทำลายไซโลสให้เป็นเฟอร์ฟูรัล (furfural) ซึ่งเป็นสารพิษที่เกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิส

2.5.4 การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพร่วมกับทางเคมี (physicochemical pretreatment) (รัชพล พะวงค์รัตน์, 2558)

2.5.4.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion)

วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส การระเบิดด้วยไอน้ำโดยส่วนใหญ่แล้วจะทำที่อุณหภูมิช่วง 160-260 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 0.69-4.82 เมกะปาสคาล วัตถุดิบจะถูกผสมกับไอน้ำอึดตัวที่ความดันสูง แล้วทำการลดความดันอย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้เกิดการแยกเอาเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากกันที่อุณหภูมิสูง โดยส่วนของเฮมิเซลลูโลสจะละลายในน้ำที่ควบแน่นจากไอน้ำ ปัจจัยที่มีผลในกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือ เวลาที่ใช้ อุณหภูมิ ขนาดของวัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ และปริมาณความชื้นที่อยู่ในวัตถุดิบ รายงานจากการศึกษาพบว่าค่าที่ดีที่สุดในการละลายเฮมิเซลลูโลสและการเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส สามารถเกิดได้ภายใต้เงื่อนไขสภาวะอย่างใดอย่างหนึ่งดังนี้คือ สภาวะที่ใช้อุณหภูมิสูง และมีการใช้เวลาที่ต่ำ (270 องศาเซลเซียส, 1 นาที) และที่สภาวะการใช้อุณหภูมิต่ำ และเวลาที่ใช้มีค่าสูง (190 องศาเซลเซียส, 10 นาที) จากรายงานของ Wright (1988) พบว่าการใช้อุณหภูมิต่ำ และเวลานานกว่าผลที่ได้มีค่าสูง การเติมกรด เช่น กรดซัลฟิวริก หรือการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำมีผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการไฮโดรไลซิส และเป็นการลดสารที่จะเป็นตัวต่อต้านในการเกิดปฏิกิริยาอื่นที่สำคัญและยังเป็นการทำให้มีการกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้อดีของวิธีการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือ มีการสูญเสียพลังงานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ด้วยวิธีทางกล การแปลงสภาพโดยวิธีทางกลจะใช้พลังงานสูงกว่า 70% เป็นที่ทราบกันดีว่าวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำนั้นจะมีผลโดยตรงกับวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เป็นไม้เนื้อแข็งและวัตถุดิบ

พวกของเหลือใช้ทางการเกษตร แต่จะมีผลน้อยมากต่อวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เป็นไม้เนื้ออ่อน วัสดุที่ผ่านกระบวนการนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการไฮโดรไลซิส แต่ข้อจำกัดของกระบวนการนี้ก็คือ ในการทำลายแยกส่วนประกอบออกจากกันในส่วนของลิกนินมักเกิดไม่สมบูรณ์ และมักเกิดเป็นกลุ่มของสารประกอบที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดจุลินทรีย์ เพราะวาล์วประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ถูกย่อยออกมาจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การใช้เอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (enzymatic hydrolysis) รวมถึงการหมักด้วย เนื่องจากองค์ประกอบที่ได้จากการย่อยออกมาเป็นสารที่เป็นตัวต่อต้าน และเป็นสารพิษต่อจุลินทรีย์ กระบวนการไฮโดรไลซิส และกระบวนการหมักทำให้ต้องมีการล้างด้วยน้ำเพื่อทำให้สารที่เป็นพิษเหล่านั้นออกไป การล้างมีผลทำให้น้ำตาลที่ได้ถูกชะล้างหรือสูญเสียไปด้วย (รัชพล พะวงศรีรัตน์, 2558)

2.5.4.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion, AFEX)

เป็นวิธีการปรับสภาพที่คล้ายคลึงกับกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ วิธีการนี้ใช้แอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิ 60-100 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันสูง (250-300 psi) (Singh et al., 2014) ระยะเวลาหนึ่ง แล้วทำการลดความดันลงซึ่งมีผลต่อวัตถุดิบโดยวัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการนี้จะมีอัตราการย่อยสลายเป็นน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของเฮมิเซลลูโลส ไม่เหมาะสมกับพืชที่มีลิกนินอยู่มาก ข้อดีของกระบวนการนี้คือ มีพื้นที่ผิวสูงทำให้เกิดการย่อยสลายได้ดี ไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และไม่ก่อสารพิษในกระบวนการ นอกจากนี้สามารถนำแอมโมเนียกลับมาใช้ได้ใหม่ และไม่ก่อให้เกิดตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการปรับสภาพด้วยวิธีอื่น (รัชพล พะวงศรีรัตน์, 2558)

2.5.4.3 ความร้อนชื้น (liquid hot water, LHW)

วิธีการนี้เป็นอีกกระบวนการที่มีการใช้ความร้อนชื้น ซึ่งจะดำเนินการอย่างช้าๆ และไม่ต้องการสารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ต้องอาศัยความดันเพื่อควบคุมสถานะของน้ำในสถานะของเหลวอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 160-240 องศาเซลเซียส โดยจะส่งผลต่อเฮมิเซลลูโลส ตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพจะอยู่ในรูปแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (slurry) โดยส่วนที่เป็นของแข็งส่วนใหญ่จะเป็นเซลลูโลส ส่วนของเหลวส่วนใหญ่จะเป็นเฮมิเซลลูโลส และเกิดน้ำตาลบางส่วน ทั้งนี้ควรมีการปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 4-7 เนื่องจากว่าในช่วงดังกล่าวทำให้เฮมิเซลลูโลสยังคงอยู่ในรูปของโอลิโกเมอร์ (oligomeric form) ช่วยลดปัญหาการเกิดรวมตัวเกิดเป็นโพลีเมอร์ใหม่อีกครั้ง (พะวงศรีรัตน์, 2558) พบว่าการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ทำให้ได้ไซโลสมากถึง 88-98% โดยไม่ต้องใช้กรดหรือสารเคมีอื่นช่วยในกระบวนการ เป็นวิธีการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้รับความสนใจในระดับอุตสาหกรรม แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้จำเป็นต้องใช้พลังงานสูงเนื่องจากต้องใช้เพื่อเพิ่มความดัน และใช้น้ำในปริมาณมากอีกด้วย (Singh et al., 2014)

2.5.4.4 การย่อยเปียก (wet oxidation, WO)

วิธีการนี้ใช้น้ำ และอากาศหรือออกซิเจน เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิสูงกว่า 120 องศาเซลเซียส พบว่ามีเมื่อใช้กระบวนการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยต่างและการย่อยเปียกร่วมกันจะช่วยลดปริมาณสารพิษพวก furfuraldehyde และ phenol aldehyde ดังนั้นเฟอร์ฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural; HMF) สารพิษที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จึงไม่พบในกระบวนการปรับสภาพแบบการย่อยเปียกนี้ (Singh et al., 2014)

2.5.4.5 การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave pretreatment) (รัชพล พวงศรีรัตน์, 2558)

วิธีการปรับสภาพโดยอาศัยคลื่นไมโครเวฟจัดเป็นวิธีการทางกายภาพร่วมกับทางเคมี เนื่องจากมีการใช้ความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟ และส่วนที่ใช้สารเคมีเจือจางในการแช่วัสดุ การให้คลื่นไมโครเวฟจะแตกต่างกันไปตามชนิดของวัสดุใช้เวลาระหว่าง 5-20 นาที จากการศึกษาเบื้องต้นของ รัชพล พวงศรีรัตน์ (2558) และ Zhu & Perazella (2006) พบว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟมากกว่าสารละลายกรด

2.5.4.6 การปรับสภาพด้วยคลื่นความถี่สูงอัลตราซาวด์ (ultrasonic-pretreatment) (รัชพล พวงศรีรัตน์, 2558)

วิธีการปรับสภาพด้วยคลื่นความถี่สูงอัลตราซาวด์ ยังมีรายงานเกี่ยวกับวิธีดังกล่าวแต่ผลที่ได้จากการใช้คลื่นความถี่สูงอัลตราซาวด์พบว่าส่งผลให้เกิดการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ได้มากขึ้น จากงานวิจัยของ Yachmenev, Condon, Klasson, & Lambert (2009) พบว่าคลื่นความถี่สูงอัลตราซาวด์มีผลทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับพื้นที่ผิวของวัสดุได้มากขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

2.5.4.7 การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ explosion) (รัชพล พวงศรีรัตน์, 2558)

วิธีการนี้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากกรดคาร์บอนิกในการเพิ่มปฏิกิริยาย่อยสลายขั้นต่อไป นิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมด้วย เช่น เอทานอล ช่วยในการกำจัดสารประเภทลิกนิน แต่วิธีการนี้ได้ผลผลิตต่ำกว่าการใช้ไอน้ำหรือแอมโมเนีย แต่ไม่เกิดตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนไฮโดรไลซิสเหมือนวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ

2.6 การออกแบบการทดลองทางสถิติ

2.6.1 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman

Plackett & Burman (1946) ได้เสนอการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยประยุกต์การออกแบบการทดลองด้วยวิธีแฟคเทอเรียล (factorial) 2 ระดับ ในการวิเคราะห์หาปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่าตอบสนองที่ต้องการจากปัจจัยจำนวนมากและมีประโยชน์ในการคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

ในการทดลองที่มีตัวแปรหรือปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายปัจจัย จะมีอุปสรรคเกี่ยวกับสิ่งทดลองที่มีจำนวนมาก เช่น ถ้าจัดสิ่งทดลองแบบ 2^7 พบว่าถ้ามีปัจจัย 7 ปัจจัย จะมีสิ่งทดลองทั้งหมด 128 สิ่งทดลอง ดังนั้นแผนการทดลอง Plackett-Burman จะใช้สำหรับการศึกษาเพื่อคัดเลือก (screening) ปัจจัยที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการทดลองที่จะศึกษา กล่าวคือจากแผนการทดลองนี้จะทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น

การจัดการทดลองนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคเทอเรียล (factorial) หรืออาจจัดให้เป็นแฟคเทอเรียลบางส่วน ที่มีการจัดให้เป็นอิสระต่อกัน (orthogonal) ใช้เพื่อคัดเลือกปัจจัยในการพัฒนาสูตร หรือพัฒนากรรมวิธีการผลิตจาก 10 – 20 ปัจจัยที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1 – 4 ปัจจัย โดยไม่ต้องทำการทดลองจำนวนมาก สามารถลดจำนวนการทดลองได้โดยใช้เทคนิคนี้ แต่การทดลองนี้มีข้อเสียคือไม่สามารถศึกษาขอบเขตหรือชนิดของปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างตัวแปรได้ วิธีนี้เหมาะที่จะใช้ในการทดลองเพื่อคัดกรองปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การจัดการทดลองจะใช้ 2^k factorial arrangement เป็นพื้นฐานโดยมีแบบแผนมาตรฐาน (ศิริพรรณ จันทร์น้ำท่วม, 2557) ดังตารางที่ 7

ในการใช้ Plackett-Burman design ต้องกำหนดสิ่งทดลองแรกเป็นดังเมตริกแถวแรก จากนั้นสิ่งทดลองต่อไปกำหนดในลักษณะโครงสร้างวน (cyclic construction) นั่นคือ นำรหัสสุดท้ายของ Initial block ขึ้นมาลำดับหน้าสุด และวนไปจนครบ N-1 รอบ ส่วนสิ่งทดลองสุดท้ายเป็น Added block คือใช้ระดับต่ำสุดทุกปัจจัย อย่างไรก็ตาม ในการวนอาจนำรหัสหน้าสุดมาต่อท้าย และวนไปจนครบ N-1 รอบได้เช่นกัน เพียงแต่ในการทดลองให้ใช้ระดับสูงหรือต่ำให้ถูกต้องตามแผนที่กำหนดหรือวางไว้เป็นสำคัญ (ศิริพรรณ จันทร์น้ำท่วม, 2557) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 7 แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง

N	ปัจจัยที่ต้องกลั่นกรอง, k=N-1																			
8	+	+	+	-	+	-	-													
12	+	+	-	+	+	-	-	+	-											
16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-						
24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษามีระดับสูง ซึ่งมีค่าเท่ากับ +1

- หมายถึง ระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษามีระดับต่ำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ -1

N หมายถึง จำนวนสิ่งทดลอง (treatment)

K หมายถึง จำนวนปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง

ที่มา: ศิริพรรณ จันทน์น้ำท่วม (2557)

ตารางที่ 8 ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรองจำนวน 7 ปัจจัย โดยมีสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 8 การทดลอง

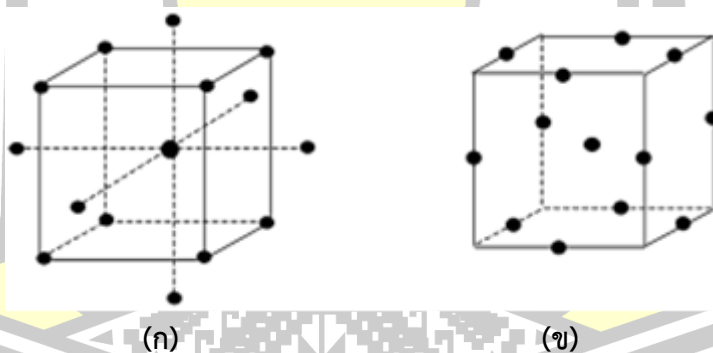
สิ่งทดลอง (treatment)	ปัจจัยที่ต้องกลั่นกรอง (factor)						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

ที่มา: ศิริพรรณ จันทน์น้ำท่วม (2557)

2.6.2 การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM)

Response surface methodology (RSM) เป็นการรวบรวมทางสถิติและเทคนิคทางคณิตศาสตร์ที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ เพื่อหาคุณลักษณะของคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า ตัวแปรตอบสนองหรือผลลัพธ์ โดยในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของผลลัพธ์กับปัจจัยการทดลอง จะต้องมีการวางแผน และออกแบบการทดลองให้เหมาะสมกับลักษณะของข้อมูลด้วย

การออกแบบการทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองที่อาศัยค่ากลางของข้อมูลจากระดับปัจจัยที่ส่งผลต่อตัวแปรตอบสนองสูงสุด โดยนิยมออกแบบการทดลอง 2 วิธี คือการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD) และ Central Composite (CCD) โดยใช้การกระจายระดับของข้อมูลจากศูนย์กลาง เพื่อศึกษาระดับของปัจจัยที่ส่งผลต่อตัวแปรตอบสนองสูงสุด ลักษณะการวางตำแหน่งและการกระจายระดับของปัจจัย แสดงดังภาพที่ 7 เห็นได้ว่าการออกแบบการทดลองแบบ BBD นั้นจะเน้นที่จุดรอบๆ ค่ากลาง (center point) โดยไม่รวมค่าการกระจายในระดับแกน (star point) และค่าที่มุม (factorial point) ทำให้ค่าคงที่ได้ไม่ครอบคลุมปลายสุดของระดับปัจจัย ดังนั้นการออกแบบการทดลองจึงได้รับความนิยมมากกว่า (ศิริพรรณ จันทร์น้ำท่วม, 2557)



ภาพที่ 7 โมเดลแสดงการกระจายของปัจจัย (ก) คือ แผนการทดลองแบบ Central Composite design (ข) คือ แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design

(Ansari & Hughes, 2016)

การทำพื้นผิวตอบสนองนั้นมีจุดประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนอง (Y) กับกลุ่มของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตอบสนองนั้นๆ วิธีการดังกล่าวนี้ใช้การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) มาประยุกต์ในการหารูปแบบความสัมพันธ์ที่เรียกว่ารูปแบบโพลิโนเมียล

(polynomial mode) โดยทั่วไปรูปแบบของพื้นผิวตอบสนองจะพิจารณารูปแบบโพลิโนเมียลลำดับที่ 1 (first order model) หรือลำดับที่ 2 (second order model) ส่วนการประมาณค่าพารามิเตอร์หรือสัมประสิทธิ์การถดถอยในรูปแบบดังกล่าวจะใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด

รูปแบบโพลิโนเมียลลำดับที่ 1 โดยทั่วไปมีการนำมาเฉพาะบางแผนการทดลอง คือการออกแบบเชิงแฟคทอเรียล 2 ระดับ (2^k Factorial)

รูปแบบโพลิโนเมียลลำดับที่ 2 มีแผนการทดลอง เช่น Central Composite Design, การออกแบบเชิงแฟคทอเรียล 3 ระดับ (3^k Factorial) เป็นต้น คือจะต้องมีระดับการทดลองอย่างน้อย 3 ระดับซึ่งรูปแบบโพลิโนเมียลลำดับที่ 2 สำหรับ k ตัวแปรในรูปแบบดังสมการที่ 1

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่ Y คือ ค่าทำนายการตอบสนอง

β_0 คือ ค่าโมเดลทดลอง

β_i คือ สัมประสิทธิ์เชิงตรง

β_{ii} คือ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ squared effect

β_{ij} คือ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร

$X_i X_j$ คือ ตัวแปรอิสระ (รหัสตัวเลข)

2.6.3 การวิเคราะห์การถดถอย

การวิเคราะห์การถดถอยเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวแปรขึ้นไป ในการวิเคราะห์การถดถอยจะเรียกตัวแปรที่สนใจว่า ตัวแปรตาม (dependent variable) ส่วนตัวแปรที่แทนปัจจัยต่างๆ เรียกว่า ตัวแปรอิสระ (independent variable)

โดยทำการพิจารณารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามและตัวแปรอิสระ แล้วสร้างรูปแบบการถดถอยเพื่อแทนลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร และสร้างสมการการถดถอย (regression equation) จากรูปแบบที่กำหนด โดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least squares method) นอกจากนี้สมการการถดถอยที่สร้างขึ้นจะเป็นสมการที่เหมาะสมหรือไม่นั้น จะพิจารณาได้จากค่าสถิติและการทดสอบสมมติฐานค่าสถิติที่ใช้ เช่น ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจปรับแล้ว (adjusted coefficient of determination; R^2_{adj}) ส่วนการทดสอบสมมติฐานเป็นการพิจารณาว่ามีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัว

แปร มีอิทธิพลหรือมีส่วนในการอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามหรือไม่ (นวรรตน์ จันทรกระเวณ, 2548)

ในการวิเคราะห์การถดถอย 1 ตัวแปร เรียกว่า การวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (simple regression analysis) และการวิเคราะห์การถดถอยที่มากกว่า 1 ตัวแปร เรียกว่า การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (multiple regression analysis) โดยมีข้อกำหนดในการวิเคราะห์การถดถอย ดังนี้

- 1) ข้อมูลตัวแปรตามมีการแจกแจงแบบปกติ
- 2) ค่าเฉลี่ยของค่าคลาดเคลื่อนมีค่าเท่ากับศูนย์
- 3) ความแปรปรวนของค่าคลาดเคลื่อนมีค่าคงที่
- 4) ค่าคลาดเคลื่อนแต่ละตัวเป็นอิสระต่อกัน

2.6.4 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย

2.6.4.1 Normal probability plot ของค่าคลาดเคลื่อน

เป็นวิธีการสร้างกราฟที่สร้างจากค่าข้อมูลจริงที่เกิดขึ้นกับค่าที่คาดไว้ (expected value) ถ้าข้อมูลตัวอย่างสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติแล้วค่าที่คาดไว้จะเป็นเส้นตรง และค่าจริงจะอยู่รอบๆ เส้นตรงนั้น โดยค่าที่อยู่เหนือเส้นตรงแสดงว่าค่าจริงมากกว่าค่าที่คาดไว้ ส่วนค่าที่อยู่ใต้เส้นตรง คือค่าจริงน้อยกว่าค่าที่คาดไว้จึงใช้ในการตรวจสอบความคลาดเคลื่อนมีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่

2.6.4.2 การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

เป็นการตรวจสอบความเป็นอิสระหรือความคงที่ของความคลาดเคลื่อนโดยใช้กราฟการกระจาย (scatterplot) ระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน Y กับค่า regression predicted value บนแกน X พบว่าจุดมีการกระจายอย่างไม่มีรูปแบบและการกระจายรอบเส้นกึ่งกลางศูนย์ แสดงว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่

2.6.4.3 การทดสอบค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน

เป็นการตรวจสอบความเหมาะสมของค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน โดยใช้กราฟระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน Y กับค่า run number บนแกน X พบว่ากราฟมีการกระจายตัวแบบสุ่มรอบเส้นกึ่งกลางศูนย์ และไม่มีลักษณะของแนวโน้มหรือมีรูปแบบอย่างชัดเจน แสดงว่าค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน

2.6.4.4 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2)

เป็นสัดส่วนหรือเปอร์เซ็นต์ที่ตัวแปรทำนายสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

$$R^2 = \frac{\text{ความผันแปรของ } Y \text{ เนื่องจากอิทธิพลของ } X_1, X_2, \dots, X_k}{\text{ความผันแปรทั้งหมด}}$$

สมการที่มักนำไปใช้ควรมีค่า R^2 อย่างน้อย 0.75 หากสูงกว่า 0.90 ถือว่าดีมาก (ค่า R^2 มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดยที่ 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ใดๆ ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม แต่ที่ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์) เนื่องจากข้อเสียของสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ คือเมื่อตัวแปรอิสระเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า R^2 เพิ่มขึ้นตามไปด้วย อีกทั้งในกรณีที่จำนวนข้อมูลในตัวอย่างไม่น้อย การพิจารณาค่า R^2 อาจคลาดเคลื่อนเพราะค่า R^2 มีค่าสูงเกินความเป็นจริง การแก้ไขทำได้โดยใช้ค่า adjust R^2 แทน ซึ่งถ้า adjust R^2 มีค่ามากกว่า 64% (>0.64) แสดงว่ารูปแบบสมการเหมาะสม

2.6.4.5 การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมโดยการหาค่าเบี่ยงเบนของข้อมูล

การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมซึ่งเป็นการเปรียบเทียบของข้อมูลที่ได้จากการทดลองกับข้อมูลที่ได้จากการทำนาย โดยการหาค่าเบี่ยงเบนระหว่างข้อมูลที่ได้จากการทดลองและข้อมูลที่ได้จากการทำนาย เขียนได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ค่าเบี่ยงเบน Error (\%)} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการทดลอง} - \text{ค่าที่ได้จากการทำนาย}}{\text{ค่าที่ได้จากการทำนาย}} \times 100$$

2.6.5 การเลือกสมการการถดถอยที่ดีที่สุด

ในการวิจัยเชิงปริมาณตัวแปรอิสระที่นำมาศึกษาจะมีหลายตัวแปร สมการการถดถอยที่เหมาะสมควรเป็นสมการที่มีตัวแปรอิสระน้อยที่สุด และอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามได้ดีที่สุด ดังนั้นเมื่อมีตัวแปรอิสระหลายตัวจึงควรเลือกตัวแปรอิสระที่สำคัญ การเลือกตัวแปรอิสระที่สำคัญจะทำได้ด้วยวิธีการเลือกสมการการถดถอยแบบต่างๆ ซึ่งวิธีการเลือกสมการการถดถอยที่ดีที่สุดที่ใช้กันมาก ได้แก่ วิธีพิจารณาทุกสมการ (all possible regression) วิธีลดตัวแปรอิสระ (backward elimination procedure) วิธีเพิ่มตัวแปรอิสระ (forward selection procedure) และวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน (stepwise procedure) (นวรรตน์ จันทร์กระเวน, 2548)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yu et al. (2011) ศึกษาการผลิตไขมันโดยยีสต์สะสมไขมันจากไฮโดรไลเซตฟางข้าวสาลีที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง โดยทำการปรับสภาพฟางข้าวสาลีด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2% (ปริมาตรโดยปริมาตร) ใช้ฟางข้าวสาลีเข้มข้น 10% (น้ำหนักโดยปริมาตร) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นแยกส่วนเหลวไฮโดรไลเซตที่ได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงและกรอง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขจัดสารพิษในไฮโดรไลเซตด้วยกระบวนการปรับต่างเกิน (overliming) พบว่าไฮโดรไลเซตฟางข้าวสาลีก่อนขจัดสารพิษประกอบด้วยกลูโคส โซโลส อะราบิโนส กาแลคโตส และกรดอะซิติก 3.7, 19.6, 4.7, 1.2 และ 4.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อขจัดสารพิษแล้วมีองค์ประกอบต่างๆ ในปริมาณเท่ากับ 3.2, 14.0, 3.7, 0.8 และ 4.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบสารพิษที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเจือจาง คือ เฟอร์ฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural; HMF) ซึ่งไฮโดรไลเซตก่อนปรับสภาพมีปริมาณเฟอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลเท่ากับ 0.44 และ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อผ่านกระบวนการขจัดสารพิษแล้วจะลดลงเหลือ 0.03 และ 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดสอบเพาะเลี้ยงยีสต์ในสารตั้งต้นไฮโดรไลเซตฟางข้าวสาลีพบยีสต์ 5 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ คือ *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi* และ *Yarrowia lipolytica* โดย *C. curvatus* สามารถผลิตไขมันได้สูงสุดเท่ากับ 4.2 กรัมต่อลิตร และ 5.8 กรัมต่อลิตร ในไฮโดรไลเซตฟางข้าวสาลีที่ผ่านการขจัดสารพิษและไม่ขจัดสารพิษ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารพิษเฟอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลจะส่งผลกระทบต่อการเจริญของ *C. curvatus* เมื่อมีความเข้มข้นสูงถึง 1 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันจะพบ กรดปาล์มมาติก (C16:0) กรดสเตียริก (C18:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) เป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *C. curvatus* มีความต้านทานต่อสารพิษจากไฮโดรไลเซตฟางข้าวสาลีจึงไม่จำเป็นต้องกำจัดสารพิษในไฮโดรไลเซตก่อนนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อการผลิตไขมัน

Tsigie, Wang, Truong, & Ju (2011) ศึกษาการผลิตไขมันโดยยีสต์ *Yarrowia lipolytica* Po1g จากไฮโดรไลเซตชานอ้อย ใช้ชานอ้อยที่แห้งและผ่านการบดจนได้ขนาดเล็กกว่า 0.75 มิลลิเมตร จากนั้นปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.5% ในอัตราส่วน 1:15 (กรัมต่อมิลลิลิตร) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นแยกส่วนเหลวไฮโดรไลเซตที่ได้ด้วยการกรอง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขจัดสารพิษด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเซตชานอ้อยด้วยวิธี DNS

และวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และอะราบินอสด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิทซ์ 21.38 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบินอส เพอร์ฟูรัลและไฮดรอกซิลเมทิลเพอร์ฟูรัล เท่ากับ 3.98, 13.59, 2.78, 0.12 และ 0.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อผ่านกระบวนการขจัดสารพิษจะพบองค์ประกอบต่างๆ ลดลง เท่ากับ 3.93, 13.51, 2.58, 0.09 และ 0.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการทดลองเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่เป็นไฮโดรไลเซชันอ้อยที่ไม่ผ่านการขจัดพิษ และผ่านการขจัดพิษ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส ที่ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ ได้แก่ เปปโตน ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรท หรือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่ายีสต์ *Yarrowia lipolytica* Po1g เจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้ไฮโดรไลเซชันอ้อยที่ผ่านการขจัดพิษเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณไขมัน เท่ากับ 11.42 กรัมต่อลิตร และ 58.5% ตามลำดับ

Huang et al. (2012) ศึกษาการผลิตไขมันโดยยีสต์ *Trichosporon fermentans* จากไฮโดรไลเซชันอ้อยด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM) ใช้ขานอ้อยที่ผ่านการบดละเอียดจนได้ขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร ผสมกับกรดซัลฟิวริกเจือจาง 1.5% (ปริมาตรโดยปริมาตร) ใช้ขานอ้อย 10% (น้ำหนักโดยปริมาตร) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นแยกส่วนเหลวไฮโดรไลเซชันที่ได้ด้วยการกรอง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขจัดสารพิษในไฮโดรไลเซชันด้วยกระบวนการปรับต่างเกิน (overliming) และการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ เพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ศึกษาค่าที่เหมาะสมของ 4 ปัจจัยหลัก ได้แก่ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น pH และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken design เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยหลัก 3 ระดับ ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตไขมันโดยยีสต์ *Trichosporon fermentans* คือ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 165 ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 11% pH เท่ากับ 7.6 และใช้เวลาการเพาะเลี้ยง 9 วัน จะได้ผลผลิตไขมัน 15.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่าทำนาย (15.6 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีปริมาณผลผลิตไขมันเพิ่มขึ้นถึง 32.8% เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตไขมันก่อนการใช้วิธี RSM ในการหาสภาวะที่เหมาะสม เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันจะพบกรดปาล์มมาติก กรดสเตียริก กรดโอเลอิก และกรดลิโนเลอิก เป็นองค์ประกอบหลัก และเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวถึง 65% ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีความคล้ายคลึงกับน้ำมันจากพืชที่นำมาผลิตน้ำมันไบโอดีเซล ดังนั้น *Trichosporon fermentans* จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตไขมันเพื่อการผลิตไบโอดีเซล

ดีเซลต่อไปในอนาคต และยังสามารถเจริญได้ในสารตั้งต้นราคาถูกอย่างลิกโนเซลลูโลสเพื่อลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงได้ด้วย

Huang et al. (2013) ศึกษาการผลิตไขมันโดยยีสต์ *Trichosporon coremiiforme* จากไฮโดรไลเซตซังข้าวโพดโดยการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไออุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ขจัดสารพิษในไฮโดรไลเซตด้วยกระบวนการปรับต่างเกิน (overliming) และการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบปริมาณน้ำตาลเข้มข้น 45.7 กรัมต่อลิตร หลังจากการขจัดสารพิษพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลง วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลในไฮโดรไลเซตด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง พบปริมาณน้ำตาลไซโลส กลูโคส และอะราบินอส เท่ากับ 37.9, 2.9 และ 4.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วนำมาเป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยง *T. coremiiforme* ซึ่งให้เซลล์ชีวมวลเท่ากับ 20.4 กรัมต่อลิตร และปริมาณไขมัน 37.8% หลังการเพาะเลี้ยง 8 วัน ดังนั้น *T. coremiiforme* จึงเป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันได้สูงโดยใช้ลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น

Chen et al. (2013) ศึกษาผลของแหล่งอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ *Trichosporon cutaneum* จากไฮโดรไลเซตซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง หลังการขจัดสารพิษพบปริมาณกลูโคส ไซโลส และอะราบินอส เท่ากับ 2.9, 37.9 และ 4.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ศึกษาการเจริญและผลิตไขมันของยีสต์ในอาหารสังเคราะห์ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน (ชนิดเดี่ยวที่จำลองจากองค์ประกอบของไฮโดรไลเซตซังข้าวโพด) แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ pH และปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น ผลการทดลองพบว่า *Trichosporon cutaneum* เจริญได้ดีในน้ำตาลเซลโลไบโอส โดยมีเซลล์ชีวมวล 24.1 กรัมต่อลิตร แต่สามารถผลิตไขมันได้สูงสุด 52.0% เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และในการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเซตที่เติมแหล่งไนโตรเจนก็พบว่าส่งผลต่อการเจริญของยีสต์แต่ไม่ส่งผลต่อการผลิตไขมัน นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสารอาหาร ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.3 กรัมต่อลิตร คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 0.003 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.003 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.4 กรัมต่อลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการสะสมไขมันในเซลล์ยีสต์มากขึ้น และยังพบว่าปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 5% อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และ pH ตั้งต้นเท่ากับ 6.0 ก็ส่งผลต่อการผลิตไขมันโดย *Trichosporon cutaneum* เช่นกัน ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดนี้ *Trichosporon cutaneum* จะเจริญและให้เซลล์ชีวมวล 22.9 กรัมต่อลิตร และปริมาณไขมัน 45.4%

Tampitak, Louhasakul, Cheirsilp, & Prasertsan (2015) ศึกษาการผลิตไขมันจากเฮมิเซลลูโลสและไฮโดรเซลลูโลสไฮโดรไลเซตของกากปาล์มโดยยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ใหม่ โดยรายงานว่ามีกากปาล์มที่เป็นสารประเภทลิกโนเซลลูโลสเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มจำนวนมากใน

ประเทศไทย ซึ่งเป็นแหล่งน้ำตาลที่ยีสต์สะสมไขมันสามารถใช้เพื่อการเจริญและสะสมไขมันในเซลล์ได้ โดยมีกระบวนการปรับสภาพกากปาล์ม 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5% (น้ำหนักโดยปริมาตร) ไฮโดรไลซ์เอมิเซลลูโลสปลดปล่อยน้ำตาลเพนโตสออกมา ขั้นที่สองทำการไฮโดรไลซ์กากปาล์มที่เหลือด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5% (น้ำหนักโดยปริมาตร) เพื่อปลดปล่อยน้ำตาลเฮกโซสออกมา จากนั้นศึกษาการผลิตไขมันจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินและของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ *Rhodotorula mucilaginosa* G43, *Kluyveromyces marxianus* X32 และ *Candida tropicalis* X37 โดยทั้งสามสายพันธุ์สามารถผลิตไขมันที่มีกรดไขมันหลักคือกรดปาล์มมาติก กรดสเตียริก และกรดโอเลอิก เป็นองค์ประกอบมากกว่า 70% ซึ่งคล้ายกับองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม ซึ่งให้เห็นว่าสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ต่อไป นอกจากนี้ยังศึกษาถึงปริมาณไขมันที่ผลิตได้โดยใช้กากปาล์มไฮโดรไลซ์ที่ผ่านการกำจัดสารพิษเป็นสารตั้งต้น พบว่า *C. tropicalis* X37 สามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุด 2.73 กรัมต่อลิตร ดังนั้นกากปาล์มจึงสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตไขมันโดยยีสต์สะสมไขมันในระดับอุตสาหกรรมได้ ซึ่งนอกจากจะเป็นสารตั้งต้นราคาถูก ยังเป็นสารตั้งต้นที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมแห่งแหล่งอาหารของคนและสัตว์ด้วย

Ramírez-Castrillón et al. (2017) ศึกษาวิธีการคัดเลือกยีสต์และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้ ด้วยวิธีการคัดเลือกยีสต์จากไบโอฟีลแบบ High throughput screening (HTS) ในการประเมินปริมาณไขมันที่ผลิตได้ พบยีสต์สะสมไขมันสายพันธุ์ใหม่ คือ *Meyerozyma guilliermondii* BI281A พบปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ 52.38 และ 34.97% เมื่อใช้กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ มีผลผลิตนิวทรัลลิพิด (neutral lipids) 108 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถสะสมน้ำมัน (oil) ได้เมื่อใช้กลีเซอรอลดิบจากโรงกลั่นน้ำมันไบโอดีเซลเป็นสารตั้งต้น ซึ่งไขมันที่ผลิตได้เป็น monounsaturated fatty acids (MUFA) ถึง 56 หรือ 74% เมื่อผลิตจากสารตั้งต้นกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลดิบ ตามลำดับ ดังนั้น *Meyerozyma guilliermondii* BI281A จึงเป็นยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมันเพื่อการผลิตเป็นไบโอดีเซลต่อไป

Poontawee, Yongmanitchai, & Limtong (2017) ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันจากน้ำตาลลิควิดในเซลล์ และผลขององค์ประกอบจากการย่อยสลายลิควิดในเซลล์ต่อการเจริญและการผลิตไขมันจากยีสต์ ผลการทดลองการคัดเลือกยีสต์พบ 413 ไอโซเลทที่สามารถผลิตไขมันได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำตาลลิควิดในเซลล์ การคัดเลือกเบื้องต้นด้วยการย้อมสีไนล์ เรด (nile red staining) พบ 142 ไอโซเลท ที่มีหยดน้ำมันภายในเซลล์มาก จากนั้นทดสอบการผลิตไขมันในระดับขวดเขย่าในสภาวะไนโตรเจนจำกัด และใช้กลูโคสหรือไซโลส หรือกลูโคสร่วมกับไซโลส (อัตราส่วน 2:1) ที่ความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่า

Rhodosporidium fluviale DMKU-SP314 สามารถผลิตไขมันได้สูงที่สุด 7.9 กรัมต่อลิตร เมื่อเพราะเลี้ยง 9 วัน ในสารตั้งต้นกลูโคสร่วมกับไซโลส และมีปริมาณไขมัน 55.0% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันหลักได้แก่ กรดโอเลอิก (40.2%) กรดปาล์มมาติก (25.2%) กรดลิโนเลอิก(17.9%) และกรดสเตียริก (11.1%) นอกจากนี้ไอโซเลท DMKU-SP314 ยังสามารถเจริญและผลิตไขมันได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เพอร์ฟูรัล ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล และวานิลลิน (vanillin) ดังนั้น *Rhodosporidium fluviale* DMKU-SP314 จึงเป็นยีสต์สะสมไขมันที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมันได้โดยใช้ลิกโนเซลลูโลส ไฮโดรไลเซทเป็นสารตั้งต้นได้



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

3.1.1 อุปกรณ์

- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)
- เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas chromatograph-Mass spectrometer; GCMS)
- อ่างสั่นคลื่นความถี่สูง (sonicator bath)
- เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง (electric balance)
- เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด 2 ตำแหน่ง (electric balance)
- กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ไมโครเวฟ (microwave)
- ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10-100 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- หลอดปั่นเหวี่ยงเล็ก (eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หลอดปั่นเหวี่ยง (fulcon tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- เครื่องมิกเซอร์ (tube mixer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
- ตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง (test tube) 16×150 มิลลิเมตร
- ปีกเกอร์แก้ว (beaker) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- จานเพาะเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

- ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader glass)
- หัวงักเชื้อ (Inoculating loop)

3.1.2 เคมีภัณฑ์

- กลูโคส (glucose)
- ไชโลส (xylose)
- อะราบินอส (arabinose)
- เปปโตน (peptone)
- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
- ผงมอลต์ (malt extract)
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)
- ยูเรีย (NH_2CONH_2)
- แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- กรดซิตริก ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- โซเดียมซิเตรท ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- กรด -3,5- ไดไนโตรซาลิไซลิก (3, 5-dinitrosalicylic acid, DNS)
- โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- เฟอร์ฟูรัล (furfural)
- ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-hydroxymethylfurfural; HMF)
- สารองค์ประกอบมาตรฐาน F.A.M.E. Mix, C14-C22
- เฮกเซน (hexane)
- แอมพิซิลลิน (ampicillin)
- สเตรปโตไมซิน (streptomycin)

- เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)
- กากมันสำปะหลัง (cassava pulp)
- ชานอ้อย (sugarcane bagasse)
- ผงวุ้น (Agar)
- น้ำกลั่น (distilled water)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมไฮโดรไลเซทของเสียทางการเกษตร

นำตัวอย่างกากมันสำปะหลังและชานอ้อยมาปรับสภาพทางกายภาพ โดยอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และบดด้วยเครื่องบดละเอียดนำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.2.1.1 การเตรียมไฮโดรไลเซท

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมไฮโดรไลเซท จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 2% (ปริมาตรโดยปริมาตร) โดยแปรผันปริมาณสารตั้งต้น (กากมันสำปะหลัง หรือชานอ้อย) ที่ 5 และ 10% (น้ำหนักโดยปริมาตร) และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แปรผันเวลา 30 และ 60 นาที จากนั้นทำการกรองและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนทิ้ง ปรับความเป็นกรดต่างน้ำส่วนใสเท่ากับ 6.5 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.1.2 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลในไฮโดรไลเซท

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส เป็นต้น ในตัวอย่างไฮโดรไลเซทที่เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water; DI water) และกรองผ่าน nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ดัดแปลงตามวิธีของ Liang, Jarosz, Wardlow, Zhang, & Cui (2014)

สภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง

เครื่อง HPLC	: ยี่ห้อ Shimadzu model 20 ประเทศญี่ปุ่น
Column	: ยี่ห้อ Bio-Rad Labs รุ่น HPX-87H cation-exchange ขนาด 300 × 7.8 mm ประเทศสหรัฐอเมริกา
Detector	: Refractive index detector (RID)

Injection volume	: 20 ไมโครลิตร
Mobile phase	: กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมลาร์
Flow rate	: 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที (isocratic elution)
Column oven temperature:	65 องศาเซลเซียส
Time	: 60 นาที

3.2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในไฮโดรไลเซท

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959) โดยนำไฮโดรไลเซทส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากการเตรียมในสภาวะที่ได้จากข้อ 3.2.1.2 ผสมกับสารละลายโซเดียมซิติเรท 0.05 โมลาร์ (ความเป็นกรดต่าง 4.8) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น (wavelength) 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.2.2 การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง และโรงงานผลิตน้ำตาล จากจังหวัดกาฬสินธุ์ ได้แก่ ดินตะกอนบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสีย น้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำเสีย กากมันสำปะหลังจากจตุรรม (ก่อนล้าง หลังล้าง และหลังผ่านกระบวนการผลิต) ชานอ้อยจากจตุรรมทั้งชานอ้อย เป็นต้น ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยตัวอย่างของแข็งเก็บในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ส่วนตัวอย่างของเหลวเก็บด้วยขวดแก้วปลอดเชื้อที่มีฝาปิดสนิท พร้อมติดฉลากระบุรายละเอียดของตัวอย่างข้างภาชนะบรรจุ ตัวอย่าง เก็บรักษาโดยการแช่เย็นตัวอย่างในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่ระหว่างการขนส่งกลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดังกล่าว โดยชั่งตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP ที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) กลูโคส 10 กรัม เปปโตเน 5 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัม ผงมอลต์ 3 กรัม โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัม (Sankh et al., 2013) ที่เติมแอมพิซิลลินและ สเตอริปโตไมซินเข้มข้นอย่างละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Thabet, Pasha, Ahmed, & Linga, 2012) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางลำดับส่วนด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และดูตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สเปรด (spread plate technique) ลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGYP บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันมาขีด (streak plate technique) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บไอโซเลทยีสต์ที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.3 การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเซท

ศึกษาการเจริญของไฮโซเลทยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.2 ขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไฮโดรไลเซทจากมันสำปะหลังและชานอ้อย ที่เติมสารสกัดจากยีสต์เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้ไปศึกษาการผลิตไขมันสะสมในเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อนำเซลล์มาหาค่าหนักเซลล์แห้งและสกัดน้ำมันที่สะสมในเซลล์ (lipid content)

3.2.3.1 การสกัดน้ำมัน

ทำตะกอนเซลล์แห้งให้แตกด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์ (Xavier, Coradini, Deckmann, & Franco, 2017) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำน้ำส่วนใสมาสกัดตามวิธีของ Bligh-Dyer's method ด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (Tampitak et al., 2015) ระเหยแห้งน้ำส่วนใสและชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณไขมันสะสมในเซลล์เปรียบเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง มีหน่วยเป็นร้อยละของไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.4 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากยีสต์ที่คัดเลือกได้

นำยีสต์ที่สามารถผลิตไขมันสะสมในเซลล์ได้สูงที่สุด โดยเปรียบเทียบปริมาณไขมันกับน้ำหนักเซลล์แห้งจากข้อ 3.2.3 มาศึกษาการเจริญสำหรับเตรียมหัวเชื้อ โดยเฉพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาหาค่าหนักเซลล์แห้ง

3.2.4.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทของเสียทางการเกษตร ได้แก่ กากมันสำปะหลัง และชานอ้อย โดยปรับความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจน 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract; YE) เปปโตเน (peptone) ยูเรีย (urea) แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfat) และแอมโมเนียมไนเตรท (ammonium nitrate) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาหาค่าหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำมันที่สะสมในเซลล์

3.2.4.2 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman

ศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ของไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อย ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน สารอาหารเข้มข้น 10 เท่า (Nutrient (กรัมต่อลิตร); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 กรัม, KH_2PO_4 2 กรัม, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.003 กรัม, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.001 กรัม (Y. Yu et al., 2011) ความเป็นกรดต่าง (pH) ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum size) ที่ปรับระดับความขุ่นของเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ($OD_{600}=1.0$) และอุณหภูมิ (Temperature) ที่มีผลต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ในระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที โดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett–Burman กำหนดค่า low level (-1) และ high level (+1) ทั้ง 6 ปัจจัย ดังแสดงในตารางที่ 9-10 ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อย ตามลำดับ และมีจำนวนการทดลองทั้งหมด 16 การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 11-12 ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อย ตามลำดับ

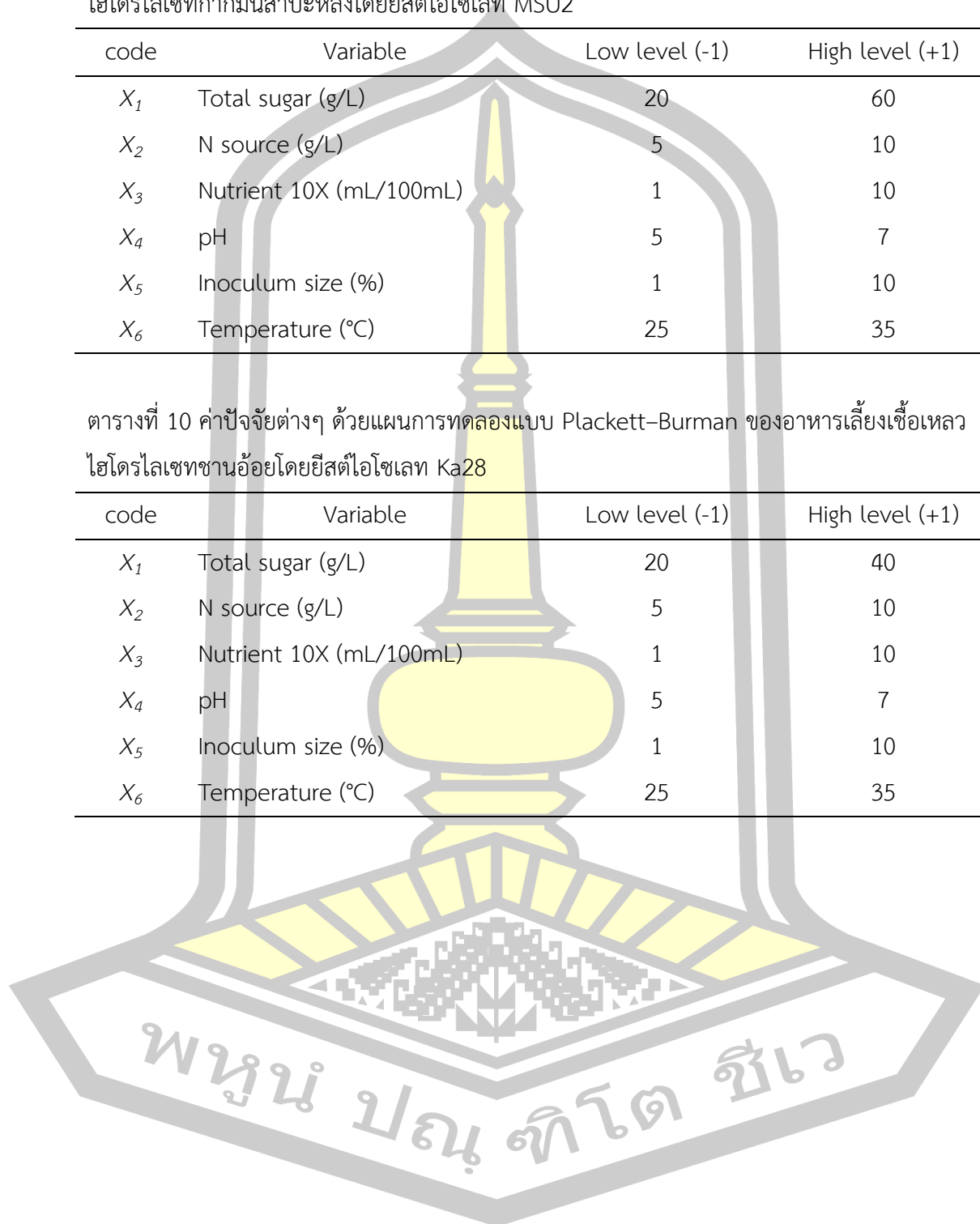


ตารางที่ 9 ค่าปัจจัยต่างๆ ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2

code	Variable	Low level (-1)	High level (+1)
X_1	Total sugar (g/L)	20	60
X_2	N source (g/L)	5	10
X_3	Nutrient 10X (mL/100mL)	1	10
X_4	pH	5	7
X_5	Inoculum size (%)	1	10
X_6	Temperature (°C)	25	35

ตารางที่ 10 ค่าปัจจัยต่างๆ ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ไฮโดรไลเซตขานอ้อยโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28

code	Variable	Low level (-1)	High level (+1)
X_1	Total sugar (g/L)	20	40
X_2	N source (g/L)	5	10
X_3	Nutrient 10X (mL/100mL)	1	10
X_4	pH	5	7
X_5	Inoculum size (%)	1	10
X_6	Temperature (°C)	25	35



ตารางที่ 11 แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ของ 6 ปัจจัย จำนวน 16 การทดลอง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตจากมันสำปะหลังโดยยีสต์เอโซ
 เลท MSU2

run	Variable/ Levels											
	Total sugar (g/L)		N source (g/L)		Nutrient 10X (mL/100mL)		pH		Inoculum size (%)		Temperature (°C)	
	X ₁	Actual	X ₂	Actual	X ₃	Actual	X ₄	Actual	X ₅	Actual	X ₆	Actual
1	-1	20	1	10	1	10	1	7	-1	1	-1	25
2	-1	20	-1	5	1	10	-1	5	1	10	1	35
3	1	60	-1	5	1	10	1	7	1	10	-1	25
4	1	60	1	10	1	10	-1	5	-1	1	-1	25
5	0	40	0	7.50	0	5.50	0	6	0	5.50	0	30
6	1	60	1	10	-1	1	-1	5	-1	1	1	35
7	-1	20	-1	5	-1	1	1	7	-1	1	1	35
8	1	60	-1	5	-1	1	-1	5	1	10	-1	25
9	0	40	0	7.50	0	5.50	0	6	0	5.50	0	30
10	0	40	0	7.50	0	5.50	0	6	0	5.50	0	30
11	1	60	-1	5	1	10	1	7	-1	1	1	35
12	-1	20	1	10	1	10	-1	5	1	10	1	35
13	-1	20	1	10	-1	1	1	7	1	10	-1	25

ตารางที่ 11 แผนการทดลองแบบ Plackett–Burman ของ 6 ปัจจัย จำนวน 16 การทดลอง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮดรอลิซัทจากมันสำปะหลังโดยยีสต์เอไอซี
 เลท MSU2 (ต่อ)

run	Variable/ Levels										
	Total sugar (g/L)	N source (g/L)	Nutrient 10X (mL/100mL)	pH	Inoculum size (%)	Temperature (°C)					
X_1	Actual	X_2	Actual	X_3	Actual	X_4	Actual	X_5	Actual	X_6	Actual
14	-1	20	-1	5	-1	1	5	-1	1	-1	25
15	0	40	0	7.50	0	5.50	6	0	5.50	0	30
16	1	60	1	10	-1	1	7	1	10	1	35

ตารางที่ 12 แผนการทดลองแบบ Plackett–Burman ของ 6 ปัจจัย จำนวน 16 การทดลอง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮดรอลิซัทจากมันสำปะหลังโดยยีสต์เอไอซี
 Ka28

run	Variable/ Levels										
	Total sugar (g/L)	N source (g/L)	Nutrient 10X (mL/100mL)	pH	Inoculum size (%)	Temperature (°C)					
X_1	Actual	X_2	Actual	X_3	Actual	X_4	Actual	X_5	Actual	X_6	Actual
1	0	30	0	7.50	0	5.50	6.00	0	5.50	0	30.00
2	0	30	0	7.50	0	5.50	6.00	0	5.50	0	30.00
3	+1	40	+1	10.00	-1	1.00	5.00	-1	1.00	+1	35.00

ตารางที่ 12 แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman ของ 6 ปัจจัย จำนวน 16 การทดลอง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตชานอ้อยโดยยีสต์เอโซเลท Ka28 (ต่อ)

run	Variable/ Levels											
	Total sugar (g/L)	N source (g/L)		Nutrient 10X (mL/100mL)		pH		Inoculum size (%)		Temperature (°C)		
	X ₁	Actual	X ₂	Actual	X ₃	Actual	X ₄	Actual	X ₅	Actual	X ₆	Actual
4	0	30	0	7.50	0	5.50	0	6.00	0	5.50	0	30.00
5	0	30	0	7.50	0	5.50	0	6.00	0	5.50	0	30.00
6	0	30	0	7.50	0	5.50	0	6.00	0	5.50	0	30.00
7	-1	20	+1	10.00	+1	10.00	+1	7.00	-1	1.00	-1	25.00
8	+1	40	-1	5.00	+1	10.00	+1	7.00	+1	10.00	-1	25.00
9	+1	40	-1	5.00	-1	1.00	-1	5.00	+1	10.00	-1	25.00
10	-1	20	-1	5.00	-1	1.00	+1	7.00	-1	1.00	+1	35.00
11	-1	20	-1	5.00	+1	10.00	-1	5.00	+1	10.00	+1	35.00
12	-1	20	+1	10.00	-1	1.00	+1	7.00	+1	10.00	-1	25.00
13	-1	20	+1	10.00	+1	10.00	-1	5.00	+1	10.00	+1	35.00
14	+1	40	+1	10.00	-1	1.00	+1	7.00	+1	10.00	+1	35.00
15	-1	20	-1	5.00	-1	1.00	-1	5.00	-1	1.00	-1	25.00
16	+1	40	+1	10.00	+1	10.00	-1	5.00	-1	1.00	-1	25.00

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ เพื่อทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองการผลิตไขมันโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้ เลือกปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการทดลองที่มีค่า $p\text{-value} < 0.05$

3.2.4.3 การศึกษาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้ ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM)

จากปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4.2 นำมาศึกษาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยหลักด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken ซึ่งเป็นวิธีการวางแผนการทดลองทุกระดับของแต่ละปัจจัย และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยหลัก 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (+1)

การวางแผนการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken ซึ่งกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษา ทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 4 จุด ทำให้ได้การทดลองทั้งหมด 16 การทดลอง เพื่อการทดลองในการหาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้ การออกแบบการทดลองใช้ทำนายค่าตอบสนองเป็นสมการพหุนามกำลังสอง (Quadratic polynomial) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์การถดถอยเชิงเส้น (Quadratic regression relationship) ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2$$

โดย Y เป็นค่าตอบสนอง, β_0 เป็นค่าคงที่หรือจุดตัดหรือ Grand mean, β_i , β_j เป็นผลเชิงเส้น (Linear effect) ของ X_i และ X_j และ β_{ij} เป็นสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระหรือผลเชิงเส้นโค้งของ X_i และ X_j ทั้งนี้บางเทอมอาจถูกตัดออกไประหว่างการวิเคราะห์เพื่อให้ได้แบบจำลองที่มีนัยสำคัญได้ค่า lack of fit ที่ไม่มีนัยสำคัญ หรือมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ที่มีค่าสูง

3.2.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่ผลิตได้จากไอโซเลทยีสต์ด้วยวิธีเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas chromatograph-Mass spectrometer; GCMS) ด้วยการนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยา esterification เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันเป็น Fatty acid methyl esters (FAME) ดัดแปลงตามวิธีของ Tariq et al. (2011)

สภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

เครื่อง GCMS	: ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GCMS-QP2010
	ประเทศญี่ปุ่น
Column	: แคปิลารีคอลัมน์ขนาด 30 m x 0.25 mmID x 0.25 μ mdf ยี่ห้อ Restek ประเทศอังกฤษ
Sample	: 1 ไมโครลิตร (Autosample)
Injector temperature	: 250 องศาเซลเซียส
Temperature program	: 120 องศาเซลเซียส 2 นาที เพิ่มเป็น 250 องศาเซลเซียส อัตรา 250 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ไว้ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (รวม 50 นาที)
Carrier gas	: ฮีเลียม
Ion source temperature	: 200 องศาเซลเซียส
Interphase temperature	: 230 องศาเซลเซียส
Injection mode	: Split (ratio 1:24)
Mode	: ESI mode 70 eV

3.2.6 การจัดจำแนกสกุลของยีสต์ทางอนุกรมวิธาน

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) และจัดจำแนกสายพันธุ์โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.2.6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGYP โดยสังเกตลักษณะและสีของโคโลนี เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และศึกษาลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.6.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำส่งยีสต์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยั้งศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ด้วยวิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ของไอโซเลทที่คัดเลือกได้ เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณยีน D1/D2 domain ของ 26S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยมีโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ดังนี้ NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG- 3') และ NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G- 3') (Kurtzman & Robnett, 1998) จากนั้นนำผลิตรหัสที่ได้จากปฏิกิริยา

PCR มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้ forward primer NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG- 3') และ reverse primer NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G- 3') นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ประมาณ 500-600 bp มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GeneBank ด้วยโปรแกรม BlastN ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> โดยร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 26S rDNA ที่ได้ จะนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดเลือก



บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปราย

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบไฮโดรไลเซทของเสียทางการเกษตร

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อยจากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 2% (ปริมาตรโดยปริมาตร) โดยแปรผันปริมาณสารตั้งต้น ได้แก่ กากมันสำปะหลัง และชานอ้อยที่ความเข้มข้น 5 และ 10% (น้ำหนักโดยปริมาตร) และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แปรผันเวลา 30 และ 60 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ไซโลส อาราบิโนส เป็นต้น ในตัวอย่างไฮโดรไลเซทด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) พบว่าการใช้สารตั้งต้น (Loading) 10% (น้ำหนักโดยปริมาตร) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มีปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ สูงกว่าการใช้สารตั้งต้น 5% และการใช้เวลานึ่งฆ่าเชื้อ 60 นาที โดยในไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังพบกลูโคสมากที่สุดเท่ากับ 48.19 กรัมต่อลิตร และในไฮโดรไลเซทชานอ้อยพบไซโลสมากที่สุดเท่ากับ 23.46 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 องค์ประกอบน้ำตาลชนิดต่างๆ ในไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง 2% โดยแปรผันแปรผันปริมาณสารตั้งต้นและเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อ

ตัวอย่าง	ปริมาณสารตั้งต้น (%)	องค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)					
		กลูโคส		ไซโลส		อาราบิโนส	
		30 นาที	60 นาที	30 นาที	60 นาที	30 นาที	60 นาที
กากมัน	5	25.02	25.16	8.31	9.74	1.53	2.00
สำปะหลัง	10	48.19	46.25	17.10	25.67	3.45	-
ชานอ้อย	5	8.16	14.16	11.40	9.34	3.06	0.49
	10	14.65	16.47	23.46	22.30	5.07	6.60

ผู้ทดลองจึงเลือกสภาวะการเตรียมไฮโดรไลเซทจากมันสำปะหลังและชานอ้อย โดยการใช้สารตั้งต้น 10% (น้ำหนักโดยปริมาตร) และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี DNS method พบว่ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 77.09 และ 50.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากกระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเจือจางในไฮโดรไลเซทด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง ในไฮโดรไลเซทจากมันสำปะหลังตรวจไม่พบเฟอร์ฟูรัล (furfural) แต่พบไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural; HMF) เท่ากับ 0.30 กรัมต่อลิตร ส่วนไฮโดรไลเซทชานอ้อยพบเฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลปริมาณเท่ากับ 0.38 และ 0.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4.2 ผลการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่าง

ศึกษาการเจริญของไอโซเลทยีสต์ที่คัดแยกได้ชิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไฮโดรไลเซทจากมันสำปะหลังและชานอ้อย ที่เติมสารสกัดจากยีสต์เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบรอยการเจริญของไอโซเลทยีสต์ ทั้งหมด 32 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงจำนวนไอโซเลทยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGYP

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท
บริษัท บางนาแปงมัน จำกัด	น้ำทิ้ง	16
	ดินตะกอน	33
	กากมันสำปะหลัง	30
บริษัท มิตรผล (กาฬสินธุ์) จำกัด	น้ำแปง	2
	น้ำทิ้ง	10
	ชานอ้อย	22

4.3 ผลการคัดเลือกยีสต์ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไฮโดรไลเซท

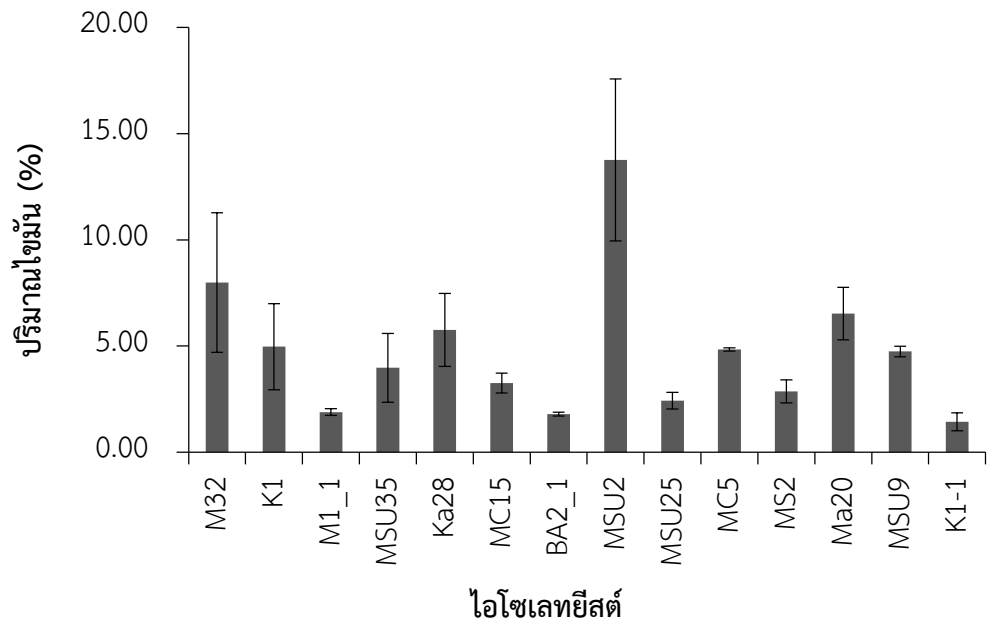
ศึกษาการเจริญของไอโซเลทยีสต์ที่คัดแยกได้ โดยชิตเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไฮโดรไลเซทจากมันสำปะหลังและชานอ้อย ที่เติมสารสกัดจากยีสต์เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร บ่มที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบการเจริญของไอโซเลทยีสต์ ทั้งหมด 32 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไฮโดรไลเซท ดังแสดงในตารางที่ 15

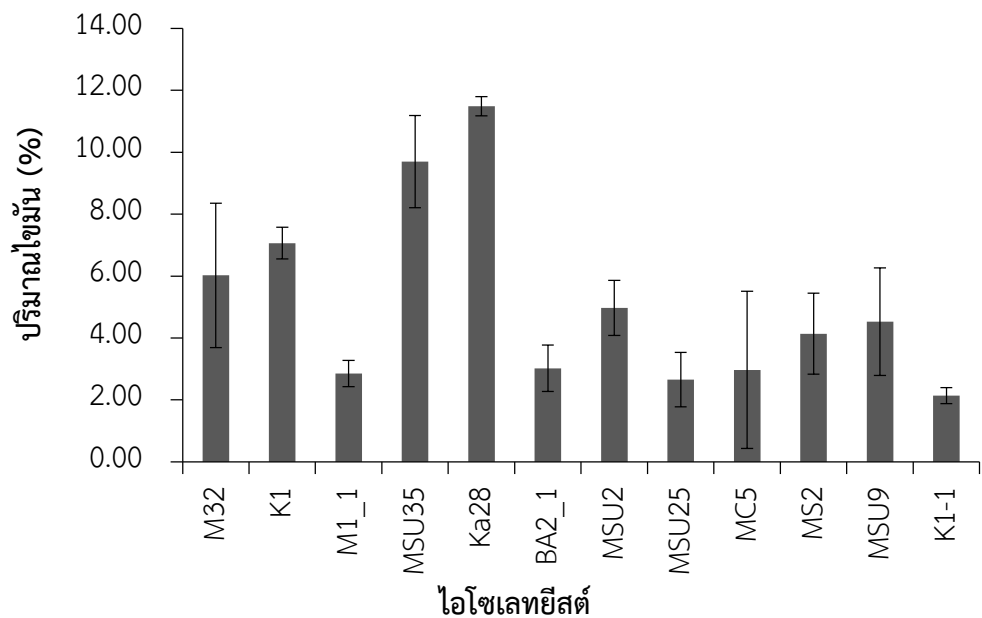
ตารางที่ 15 แสดงจำนวนไอโซเลทยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไฮโดรไลเซทกากมัน สำปะหลังและชานอ้อย

สถานที่เก็บ	ตัวอย่าง	ยีสต์ที่เจริญบนไฮโดรไลเซท		
ตัวอย่าง		จำนวน	ไอโซเลท	
บริษัท บางนา แป้งมัน จำกัด	น้ำทิ้ง	6	MC1, MC5, MC8, MC10, MC12, MC15,	
	ดินตะกอน	14	MSU2, MSU6, MSU9, MSU23, MSU25, MSU29, MSU31, MSU35, MSU38, BA1-2, BA2-1, BA10-1, BA11-1, BA12-1	
	กากมัน สำปะหลัง	4	PA26, Ka12, Ka28, Ma20	
	น้ำแป้ง	1	K1	
บริษัท มิตรผล (กาฬสินธุ์) จำกัด	น้ำทิ้ง	5	M1-1, M2-1, M3-1, M3-2, M15-2	
	ชานอ้อย	2	MS2, MS3	

นำยีสต์ทั้ง 32 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมัน สำปะหลังและชานอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่สะสมในเซลล์ พบว่ามียีสต์ 14 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญและผลิตไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง โดยมีไอโซเลท MSU2 ที่ผลิตไขมันได้สูงที่สุดคือ 13.76% (ภาพที่ 8) ซึ่งคัดแยกได้จากดินตะกอนจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง นอกจากนี้ยังมีอีก 12 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญและผลิตไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อย โดยมีไอโซเลท Ka28 ที่ผลิตไขมันได้สูงที่สุดคือ 11.48% (ภาพที่ 9) ซึ่งคัดแยกได้จากกากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง



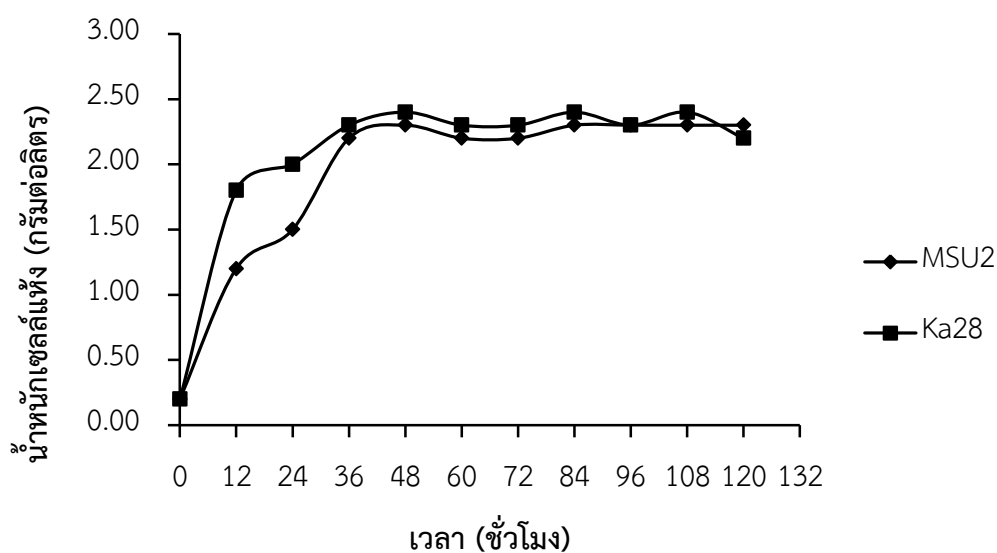
ภาพที่ 8 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมัน
สำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขูดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็น
เวลา 120 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 ปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทขานอ้อย ที่
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขูดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.4 ผลการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากยีสต์ที่คัดเลือกได้

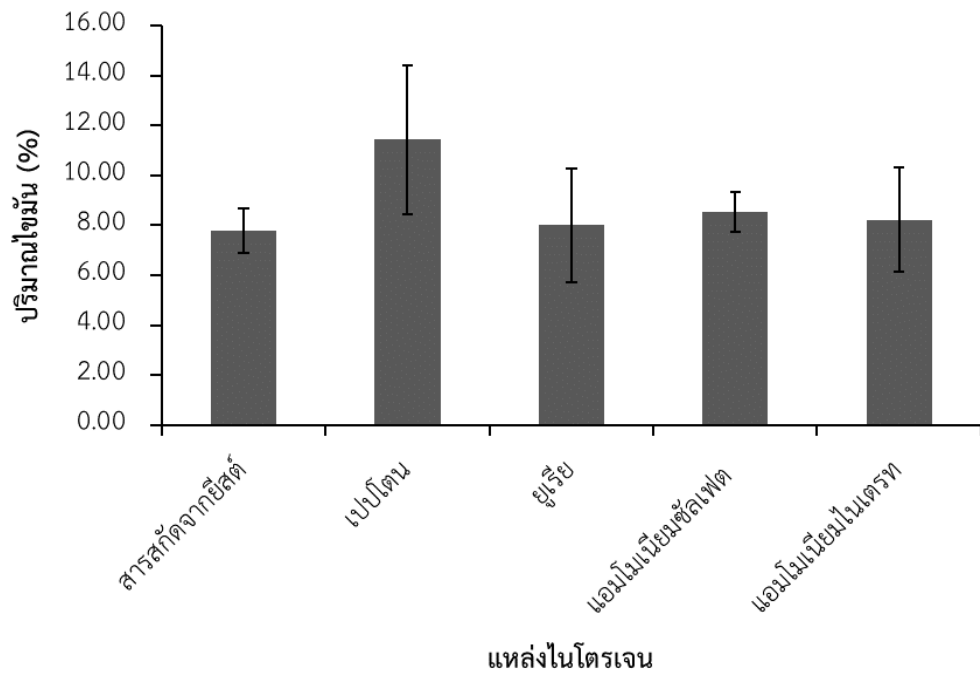
ศึกษาลักษณะการเจริญของยีสต์ โดยเฉพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP ติดตามการเจริญโดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้งทุก 12 ชั่วโมง พบว่าทั้งสองไอโซเลทมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงตั้ง 0 – 48 ชั่วโมง และหลังจากนี้เริ่มเข้าสู่ช่วงคงที่ (ภาพที่ 10) ดังนั้นผู้ทดลองจึงเลือกเวลาช่วง 36 - 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายของระยะการเพิ่มจำนวน (late exponential phase) เพื่อเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตไขมันต่อไป



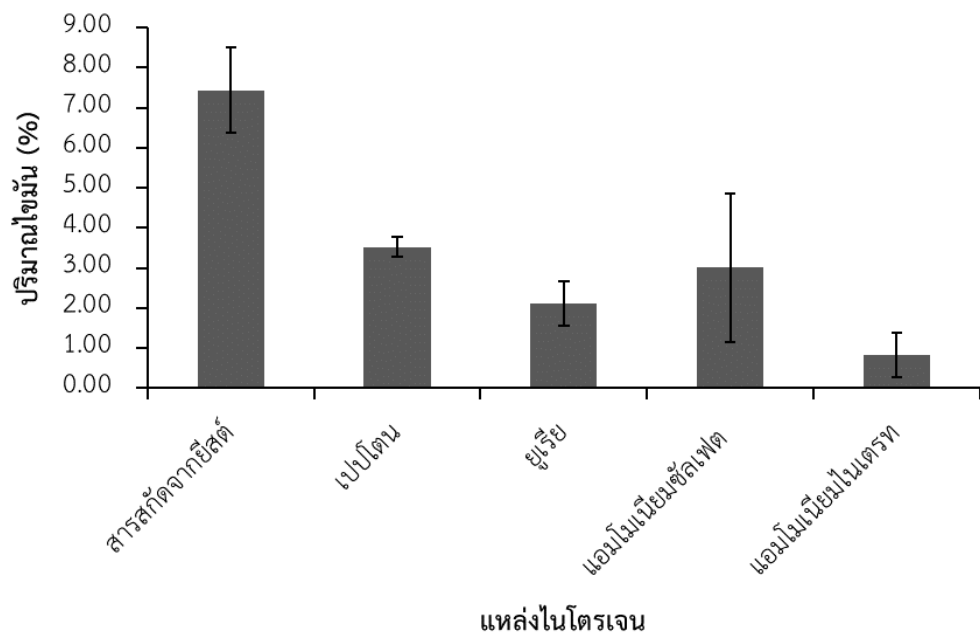
ภาพที่ 10 กราฟการเจริญของยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับขดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที

4.4.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตจากมันสำปะหลังและชานอ้อย ตามลำดับ โดยปรับความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ทำการแปรผันแหล่งไนโตรเจน 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract; YE) เปป्टอน (peptone) ยูเรีย (urea) แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) และ แอมโมเนียมไนเตรท (ammonium nitrate) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าไอโซเลท MSU2 และ Ka28 สามารถผลิตไขมันได้สูงสุดเท่ากับ 11.44 และ 7.44% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้เปป्टอน (ภาพที่ 11) และสารสกัดจากยีสต์ (ภาพที่ 12) เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ



ภาพที่ 11 การแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ไฮโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับความเข้มข้นที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง



ภาพที่ 12 การแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ไฮโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตขานอ้อย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระดับความเข้มข้นที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.4.2 ผลการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman

ใช้แผนการทดลองแบบ Plackett–Burman เพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันสะสมในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญด้วยยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังและชานอ้อย ตามลำดับ โดยปัจจัยที่นำมาศึกษาจำนวน 6 ปัจจัย วางแผนการทดลองได้ 16 การทดลอง เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 4.4.1 พบว่าไอโซเลท MSU2 สามารถผลิตไขมันได้สูงสุด 33.73% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 16)

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรมทางสถิติจาก 16 แผนการทดลอง ของปัจจัยที่สนใจศึกษา 6 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar: X_1) ความเข้มข้นของเปปโตน (Peptone: X_2) สารอาหารเข้มข้น 10 เท่า (Nutrient 10X: X_3) ความเป็นกรดต่าง (pH: X_4) ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum size: X_5) และอุณหภูมิ (Temperature: X_6) ที่กำหนดค่า low level (-1) และ high level (+1) โดยแสดงค่านัยสำคัญของปัจจัยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) พบปัจจัยที่มีค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตไขมัน จำนวน 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเป็นกรดต่าง ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 17 และพบว่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น มีค่า main effect เป็นค่าบวก หมายความว่าปัจจัยเหล่านี้ส่งผลกระทบบางบวกและมีแนวโน้มที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นได้อีก เพื่อให้ยีสต์สามารถผลิตไขมันได้มากขึ้น ส่วนอุณหภูมิมียุทธศาสตร์เป็นลบ แสดงว่าส่งผลกระทบบางลบและมีแนวโน้มที่ควรลดค่าลง จึงนำทั้ง 3 ปัจจัยนี้ไปใช้ในการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยหลักด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken ในการทดลองต่อไป

พหุ ประสิทธิภาพ ชีวะ

ตารางที่ 16 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman จำนวน 16 แผนการทดลอง ด้วย 6 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลัง

run	Variable/ Code						Response	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	Lipid content (%)	
							Observed	Predicted
1	-1	1	1	1	-1	-1	6.51	11.96
2	-1	-1	1	-1	1	1	0.00	4.48
3	1	-1	1	1	1	-1	33.73	29.30
4	1	1	1	-1	-1	-1	10.38	11.07
5	0	0	0	0	0	0	6.41	5.45
6	1	1	-1	-1	-1	1	0.00	-3.10
7	-1	-1	-1	1	-1	1	0.00	-0.76
8	1	-1	-1	-1	1	-1	20.28	23.27
9	0	0	0	0	0	0	4.40	5.45
10	0	0	0	0	0	0	5.81	5.45
11	1	-1	1	1	-1	1	6.08	4.38
12	-1	1	1	-1	1	1	7.51	3.03
13	-1	1	-1	1	1	-1	26.83	22.72
14	-1	-1	-1	-1	-1	-1	7.95	7.37
15	0	0	0	0	0	0	5.18	5.45
16	1	1	-1	1	1	1	8.13	13.69

หมายเหตุ: X_1 - X_6 แทนด้วยปัจจัยที่ศึกษา และรหัส -1, +1 แทนค่าที่ low level (-1) และ high level (+1) ดังแสดงในตารางที่ 11

พูนุ ปณุกิตโต ชีวะ

ตารางที่ 17 แสดงค่า Variables, estimated effect, regression coefficient, F และ P values ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตจากมันสำปะหลังของแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

Code	Variable	Coefficient	Effect	F-value	P-value
X_1	Total sugar (g/L)	2.48	4.97	3.65	0.0925
X_2	Peptone (g/L)	-0.72	-1.45	0.31	0.5932
X_3	Nutrient 10X (mL/100mL)	0.085	0.17	0.00	0.9495
X_4	pH	2.93	5.86	5.08	0.0543*
X_5	Inoculum size (%)	5.46	10.93	17.66	0.0030*
X_6	Temperature (°C)	-7.00	-13.99	28.96	0.0007*

หมายเหตุ: *แทนปัจจัยที่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ส่วนไอโซเลท Ka28 สามารถผลิตไขมันได้สูงสุด 20.41% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 18) ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรมทางสถิติจาก 16 แผนการทดลองของปัจจัยที่สนใจศึกษา 6 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar: X_1) ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract: X_2) สารอาหารเข้มข้น 10 เท่า (Nutrient 10X: X_3) ความเป็นกรดต่าง (pH: X_4) ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum size: X_5) และอุณหภูมิ (Temperature: X_6) ที่กำหนดค่า low level (-1) และ high level (+1) โดยแสดงค่านัยสำคัญของปัจจัยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) พบปัจจัยที่มีค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตไขมัน จำนวน 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 19 และพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า มีค่า main effect เป็นค่าบวก หมายความว่าปัจจัยเหล่านี้ส่งผลกระทบบางบวกและมีแนวโน้มที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นได้อีก เพื่อให้ยีสต์สามารถผลิตไขมันได้มากขึ้น ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์มีค่า main effect เป็นลบ แสดงว่าส่งผลกระทบบางลบและมีแนวโน้มที่ควรลดค่าลง จึงนำทั้ง 3 ปัจจัยนี้ไปใช้ในการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยหลักด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken design ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 18 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Plackett–Burman จำนวน 16 แผนการทดลอง ด้วย 6 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตชานอ้อย

run	Variable/ Code						Response	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	Lipid content (%)	
							Observed	Predicted
1	0	0	0	0	0	0	12.39	10.06
2	0	0	0	0	0	0	10.56	10.06
3	+1	+1	-1	-1	-1	+1	5.36	3.70
4	0	0	0	0	0	0	6.98	10.06
5	0	0	0	0	0	0	11.76	10.06
6	0	0	0	0	0	0	8.59	10.06
7	-1	+1	+1	+1	-1	-1	7.66	9.01
8	+1	-1	+1	+1	+1	-1	20.41	17.44
9	+1	-1	-1	-1	+1	-1	10.00	11.65
10	-1	-1	-1	+1	-1	+1	8.92	7.43
11	-1	-1	+1	-1	+1	+1	8.96	9.79
12	-1	+1	-1	+1	+1	-1	5.82	5.77
13	-1	+1	+1	-1	+1	+1	5.82	4.99
14	+1	+1	-1	+1	+1	+1	4.88	6.24
15	-1	-1	-1	-1	-1	-1	7.85	8.03
16	+1	+1	+1	-1	-1	-1	10.26	10.09

หมายเหตุ: X_1 - X_6 แทนด้วยปัจจัยที่ศึกษา และรหัส -1, +1 แทนค่าที่ low level (-1) และ high level (+1) ดังแสดงในตารางที่ 12

พูนุ ปณุกิตโต ชิว

ตารางที่ 19 แสดงค่า Variables, estimated effect, regression coefficient, F และ P values ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อยของแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

Code	Variable	Coefficient	Effect	F-value	P-value
X ₁	Total sugar (g/L)	1.53	3.06	5.62	0.0419*
X ₂	Yeast extract (g/L)	-2.40	-4.81	13.83	0.0048*
X ₃	Nutrient 10X (mL/100mL)	1.90	3.80	8.63	0.0166*
X ₄	pH	0.99	1.99	2.37	0.1580
X ₅	Inoculum size (%)	0.28	0.56	0.19	0.6768
X ₆	Temperature (°C)	-1.30	-2.59	4.03	0.0758

หมายเหตุ: *แทนปัจจัยที่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

4.4.3 ผลการศึกษาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้ ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM)

4.4.3.1 ผลการศึกษาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 จากไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

ปัจจัยที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ยีสต์ไอโซเลท MSU2 ได้แก่ ความเป็นกรดต่าง (pH: X₁) ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น (Inoculum size: X₂) และ อุณหภูมิ (Temperature: X₃) กำหนดค่า low level (-1), medium level (0) และ high level (+1) ดังแสดงในตารางที่ 20 เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ปริมาตรของเหลว 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยวิธีพื้นผิวตอบสนองใช้แผนการทดลองแบบ Box-Behnken ของ 3 ปัจจัย วางแผนการทดลองได้ 16 การทดลองและได้ผล ปริมาณไขมัน ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 20 ค่าปัจจัยต่างๆ ด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2

code	Variable	Low level (-1)	Medium level (0)	High level (+1)
X_1	pH	6	7	8
X_2	Inoculum size (%)	10	20	30
X_3	Temperature ($^{\circ}$ C)	25	27.5	30

ตารางที่ 21 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ด้วย 3 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลัง

run	Variable/ Levels						Response	
	X_1	Actual	Inoculum size (%)		X_3	Actual	Lipid content (%)	
			X_2	Actual			Observed	Predicted
1	0	7	-1	10	-1	25	13.39	17.25
2	+1	8	0	20	+1	30	12.07	14.32
3	-1	6	0	20	+1	30	25.20	28.47
4	0	7	0	20	0	27.5	34.59	33.95
5	0	7	-1	10	+1	30	17.87	16.21
6	0	7	0	20	0	27.5	30.60	33.95
7	-1	6	0	20	-1	25	29.65	27.40
8	0	7	+1	30	-1	25	25.36	27.02
9	+1	8	+1	30	0	27.5	19.40	21.00
10	+1	8	-1	10	0	27.5	17.66	17.07
11	0	7	0	20	0	27.5	34.76	33.95
12	0	7	+1	30	+1	30	20.76	16.91
13	-1	6	-1	10	0	27.5	24.87	23.27
14	+1	8	0	20	-1	25	29.81	26.54

ตารางที่ 21 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ด้วย 3 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง (ต่อ)

run	Variable/ Levels						Response	
	pH		Inoculum size (%)		Temperature (°C)		Lipid content (%)	
	X_1	Actual	X_2	Actual	X_3	Actual	Observed	Predicted
15	-1	6	+1	30	0	27.5	29.22	29.81
16	0	7	0	20	0	27.5	35.83	33.95

ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่สนใจศึกษา และค่าการตอบสนอง (ปริมาณไขมัน) ในรูปสมการกำลังสองที่แสดงค่านัยสำคัญในแต่ละปัจจัยและระหว่างปัจจัย โดยค่าการตอบสนองปริมาณไขมัน (Y) ดังแสดงในสมการที่ 2 ซึ่งในเทอมของค่ารหัส (Code value) กำหนดให้ A แทนค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น, B แทนปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และ C แทนอุณหภูมิ

$$Y = 33.95 - 3.75*A + 2.62*B - 2.79*C - 0.65*AB - 3.32*AC - 2.27*BC - 3.16*A^2 - 8.00*B^2 - 6.60*C^2 \quad \text{สมการที่ 2}$$

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของสมการแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษา และค่าการตอบสนองปริมาณไขมันที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่าสมการในเทอม Quadratic มีค่า R^2 เท่ากับ 89.66% โดยค่า R^2 แสดงถึงความสามารถของสมการในการอธิบายความแปรปรวนที่มีผลต่อการตอบสนองของสมการที่ได้ นำไปใช้ในการอธิบายผลการทดลองได้ใกล้เคียงค่าจริงในค่าการตอบสนองปริมาณไขมันถึง 89.66% จึงเป็นสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่เหมาะสมที่สุดจากสมการทั้งหมด จากค่า p-value ของ Regression เท่ากับ 0.0081 ค่าความไม่เหมาะสมของแบบจำลองกับผลการทดลอง (Lack of fit) พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p value = 0.1214) ดังแสดงในตารางที่ 22

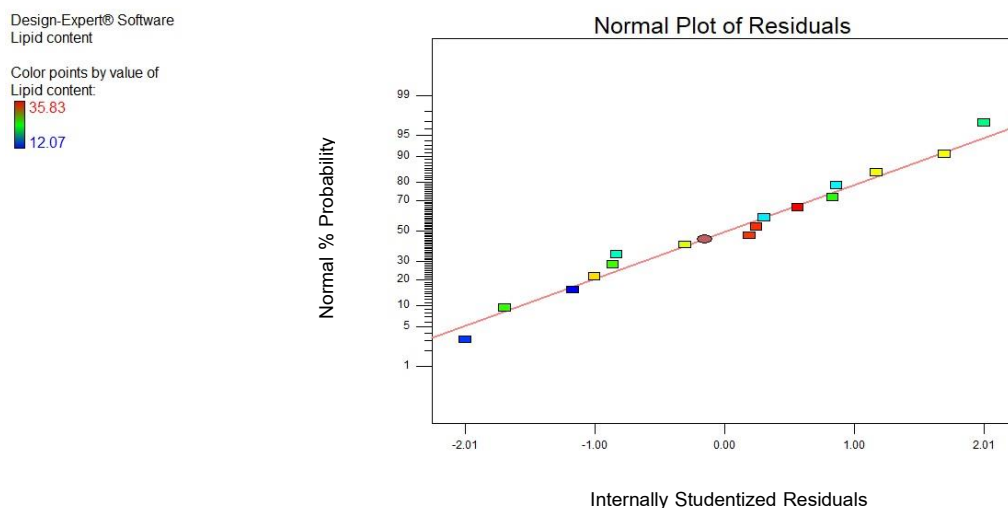
ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทจากมันสำปะหลังของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F value	p-value Prob > F	
Model	766.20	9	85.13	5.78	0.0224	Sig.
A-pH	112.50	1	112.50	7.64	0.0327	
B-Inoculum	54.86	1	54.86	3.72	0.1019	
C-Temperature	62.22	1	62.22	4.22	0.0856	
AB	1.70	1	1.70	0.12	0.7454	
AC	44.16	1	44.16	3.00	0.1341	
BC	20.61	1	20.61	1.40	0.2816	
A ²	39.94	1	39.94	2.71	0.1507	
B ²	255.84	1	255.84	17.37	0.0059	
C ²	174.37	1	174.37	11.84	0.0138	
Residual	88.38	6	14.73			
Lack of Fit	72.56	3	24.19	4.59	0.1214	Not sig.
Pure Error	15.82	3	5.27			
Cor Total	854.59	15				

การตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง (Model Adequacy Checking) เป็นการตรวจสอบความเหมาะสมและความถูกต้องของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ซึ่งมีสมมติฐานว่า รูปแบบของค่าส่วนตกค้าง (Residuals) ที่ได้จากข้อมูลในการทดลองต้องเป็นไปตามหลักการ $\epsilon \sim NID(0, \sigma^2)$ คือ Residuals มีการแจกแจงแบบปกติและเป็นอิสระด้วยค่าเฉลี่ยใกล้เคียง 0 และ σ^2 มีค่าคงตัว (Stability) จึงจะทำให้ข้อมูลจากการทดลองมีความถูกต้องและเชื่อถือได้ ผลการตรวจสอบความเป็นไปได้ตามข้อสมมติฐานแสดงดังต่อไปนี้

การตรวจสอบการกระจายว่า Residuals มีการแจกแจงเป็นแบบปกติ (Normal Distribution) โดยการพิจารณาการกระจายของค่า Residual จากภาพที่ 13 พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรงและจากการทดสอบด้วยวิธีของโคโมโกรอฟ-

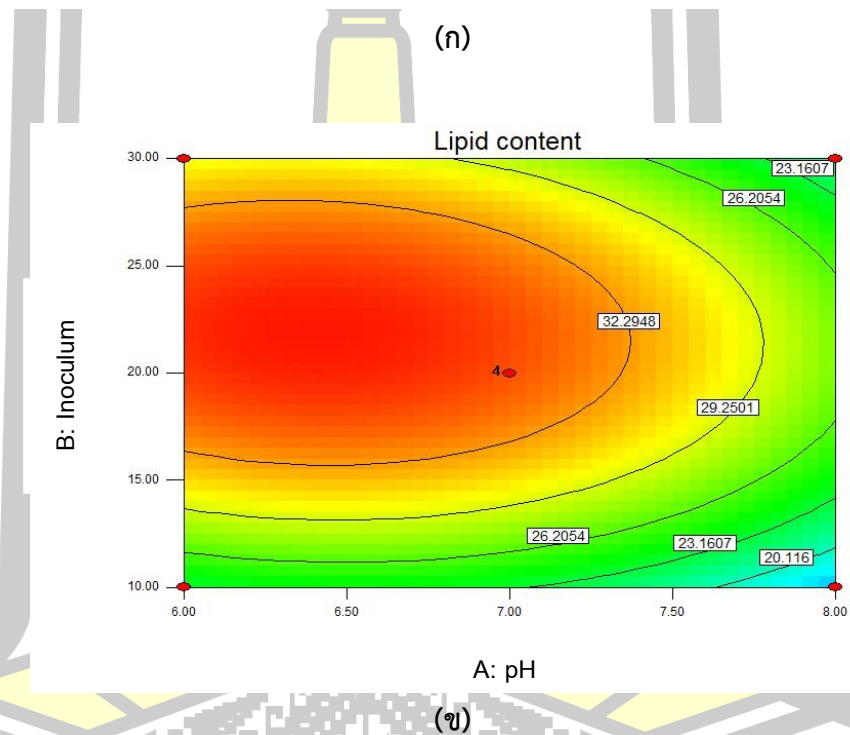
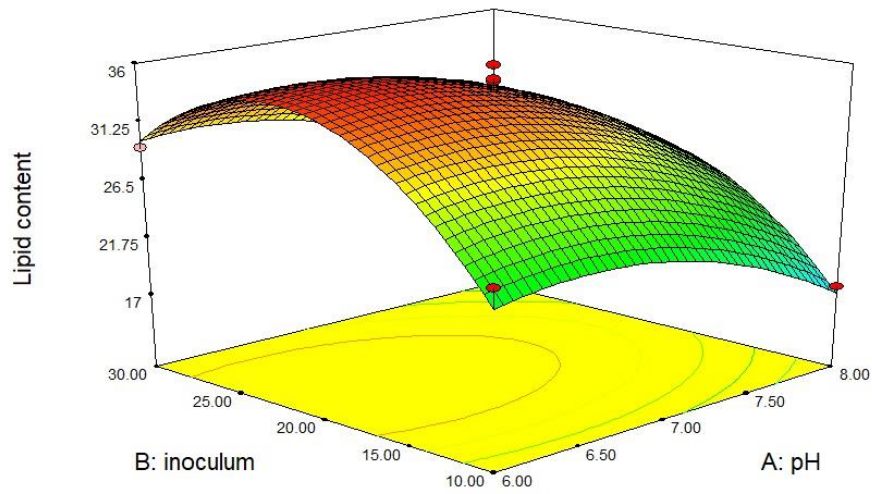
สเมียนอฟ นอร์มอลลิตีไทส (Kolmogorov-Smirnov Normality Test) ซึ่งมีค่า p -value > 0.05 ทำให้เชื่อมั่นได้ว่า Residuals มีการแจกแจงแบบปกติ



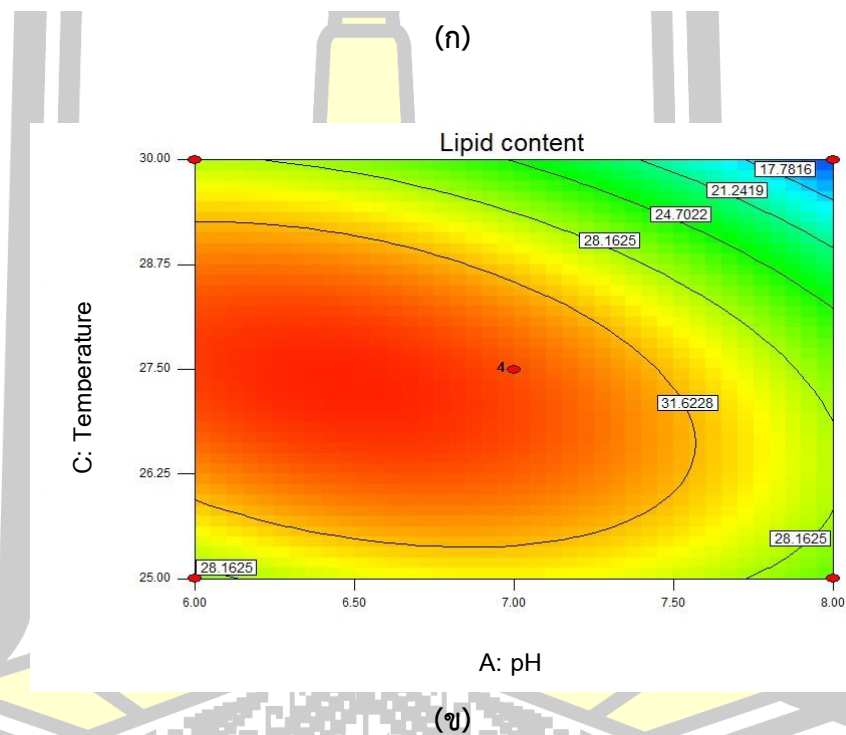
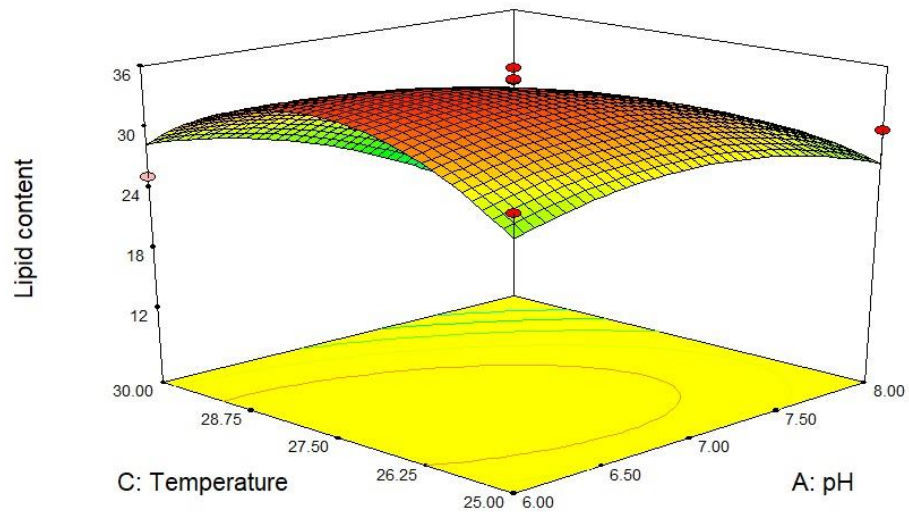
ภาพที่ 13 การกระจายแบบปกติของค่า Residual ของปริมาณไขมันของยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง

เมื่อได้สมการที่ 2 มาทำนายปริมาณไขมัน ประมวลผลด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองเป็นกราฟพื้นผิวตอบสนองและกราฟโครงร่างแสดงในภาพที่ 14-16 พบว่าเมื่อพิจารณาตามสมการของปริมาณไขมันแล้วจะมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 34.56% ในสถานะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังที่มีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 22.84% และอุณหภูมิเท่ากับ 26.28 องศาเซลเซียส

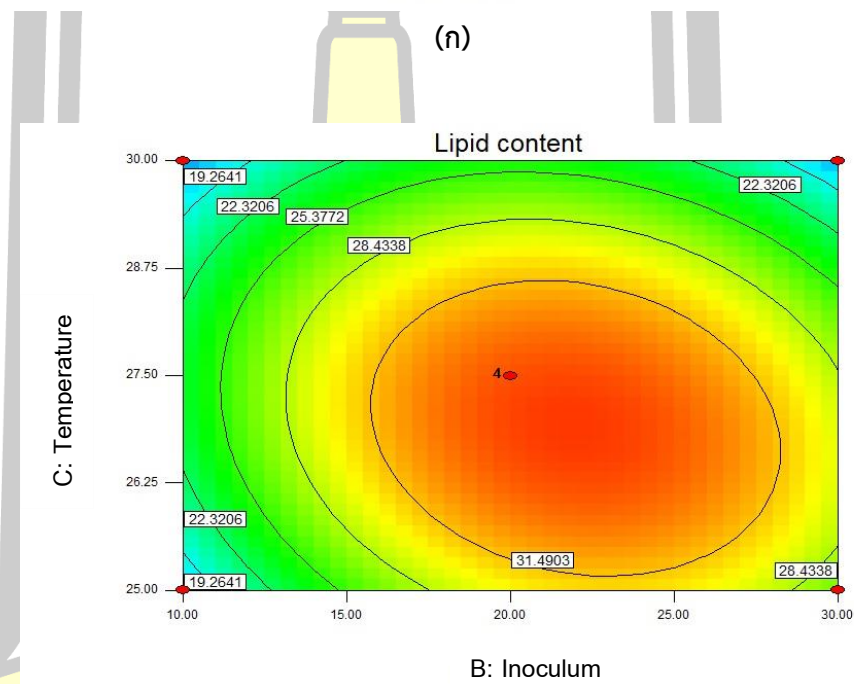
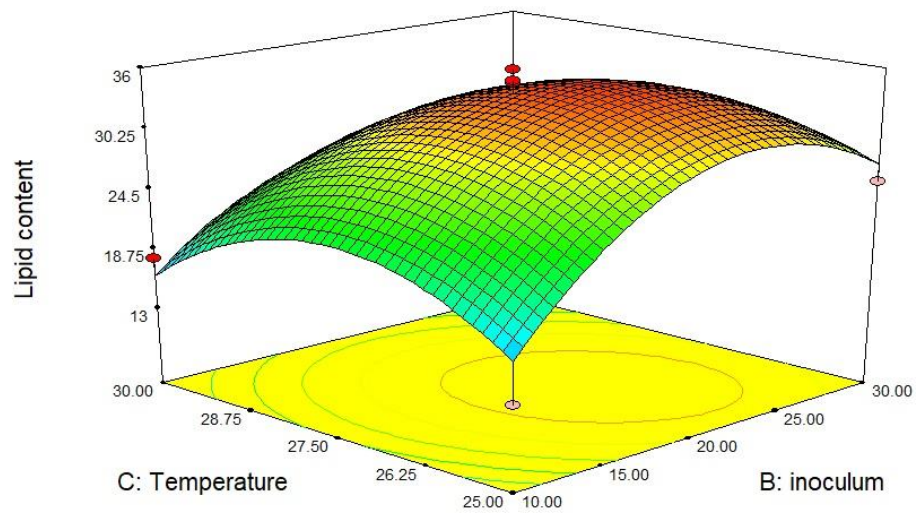
พูนุ ปณุกิตโต ชีเว



ภาพที่ 14 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่างความเป็นกรดต่างเริ่มต้นและปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลัง



ภาพที่ 15 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่างความเป็นกรดต่ำเริ่มต้นและอุณหภูมิของยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลัง



ภาพที่ 16 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่างปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นและอุณหภูมิของยีสต์ไอโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลัง

4.4.3.2 ผลการศึกษาค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 จากไฮโดรไลเซทชานอ้อยด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

ปัจจัยที่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณไขมันสะสมในเซลล์ยีสต์ไอโซเลท Ka28 ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar: X_1) ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract: X_2) และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า (Nutrient 10X: X_3) กำหนดค่า low level (-1), medium level (0) และ high level (+1) ดังแสดงในตารางที่ 23 เพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ปริมาตรของเหลว 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยวิธีพื้นผิวตอบสนองใช้แผนการทดลองแบบ Box-Behnken ของ 3 ปัจจัย วางแผนการทดลองได้ 16 การทดลองและได้ผลปริมาณไขมัน ดังแสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 23 ค่าปัจจัยต่างๆ ด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อยโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28

code	Variable	Low level (-1)	Medium level (0)	High level (+1)
X_1	Total sugar (g/L)	30	40	50
X_2	Yeast extract (g/L)	1	3	5
X_3	Nutrient 10X (mL/100mL)	10	20	30

ตารางที่ 24 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ด้วย 3 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อย

run	Variable/ Levels						Response	
	X_1	Total sugar (g/L)	X_2	Yeast extract (g/L)	X_3	Nutrient 10X (mL/100mL)	Observed	Predicted
1	+1	50.00	+1	5.00	0	20.00	19.56	19.54
2	-1	30.00	0	3.00	+1	30.00	14.09	14.06
3	0	40.00	-1	1.00	-1	10.00	19.36	19.49
4	-1	30.00	-1	1.00	0	20.00	16.27	16.29
5	0	40.00	+1	5.00	+1	30.00	16.84	16.71

ตารางที่ 24 ผลการทดลองของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ด้วย 3 ปัจจัย ของการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตชานอ้อย (ต่อ)

run	Variable/ Levels						Response	
	Total sugar (g/L)		Yeast extract (g/L)		Nutrient 10X (mL/100mL)		Lipid content (%)	
	X_1	Actual	X_2	Actual	X_3	Actual	Observed	Predicted
6	+1	50.00	0	3.00	+1	30.00	20.02	20.35
7	0	40.00	+1	5.00	-1	10.00	17.48	17.47
8	-1	30.00	0	3.00	-1	10.00	15.85	15.69
9	0	40.00	0	3.00	0	20.00	18.85	18.61
10	0	40.00	-1	1.00	+1	30.00	18.87	18.88
11	+1	50.00	0	3.00	-1	10.00	20.06	20.09
12	0	40.00	0	3.00	0	20.00	18.51	18.61
13	0	40.00	0	3.00	0	20.00	18.56	18.61
14	+1	50.00	-1	1.00	0	20.00	21.70	21.53
15	-1	30.00	+1	5.00	0	20.00	13.92	14.09
16	0	40.00	0	3.00	0	20.00	18.51	18.61

ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่สนใจศึกษา และค่าการตอบสนอง (ปริมาณไขมัน) ในรูปสมการกำลังสองที่แสดงค่านัยสำคัญในแต่ละปัจจัยและระหว่างปัจจัย โดยค่าการตอบสนองปริมาณไขมัน (Y) ดังแสดงในสมการที่ 3 ซึ่งในเทอมของค่ารหัส (Code value) กำหนดให้ A แทนปริมาณน้ำตาลทั้งหมด, B แทนความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ และ C แทนสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า

$$Y = 21.29 + 8.750E-003 * A + 0.61 * B - 0.95 * C + 0.47 * AB + 0.052 * AC - 0.038 * BC - 0.67 * A^2 - 0.39 * B^2 - 0.079 * C^2 \quad \text{สมการที่ 3}$$

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของสมการแสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษา และค่าการตอบสนองปริมาณไขมันที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่าสมการในเทอม Quadratic มีค่า R^2 เท่ากับ 99.68% โดยค่า R^2 แสดงถึงความสามารถของสมการในการอธิบายความ

แปรปรวนที่มีผลต่อการตอบสนองของสมการที่ได้ นำไปใช้ในการอธิบายผลการทดลองได้ ใกล้เคียงค่าจริงในค่าการตอบสนองปริมาณไขมันถึง 99.68% จึงเป็นสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่เหมาะสมที่สุดจากสมการทั้งหมด จากค่า p-value ของ Regression เท่ากับ 0.0013 ค่าความไม่เหมาะสมของแบบจำลองกับผลการทดลอง (Lack of fit) พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p value = 0.3241) ดังแสดงในตารางที่ 25

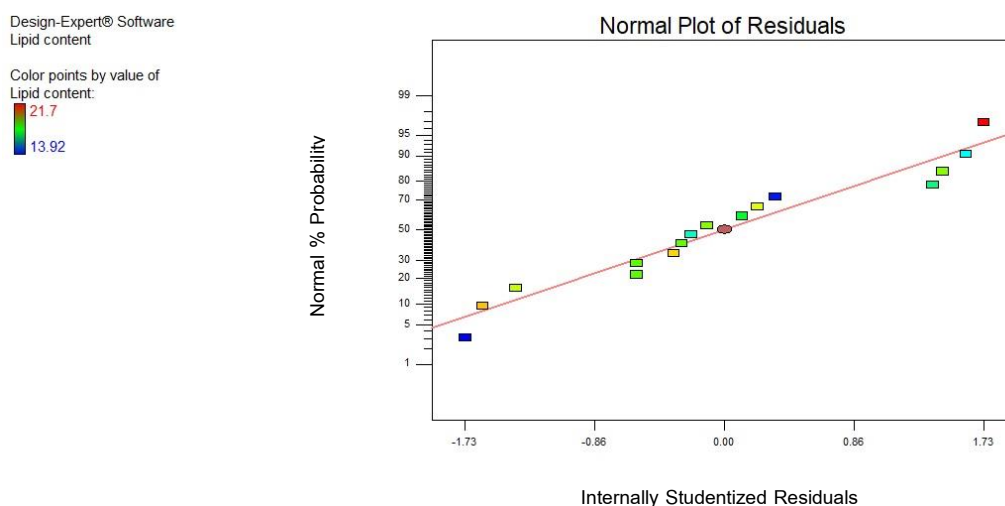
ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองการผลิตไขมันโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซชันของแผนการทดลองแบบ Box-Behnken

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F value	p-value Prob > F	
Model	70.29	9	7.81	210.65	<0.0001	Sig.
A-Total sugar	1.856E-005	1	1.856E-005	5.006E-004	0.9829	
B-Yeast extract	0.33	1	0.33	8.81	0.0250	
C-Nutrient	0.79	1	0.79	21.41	0.0036	
AB	0.90	1	0.90	24.34	0.0026	
AC	0.011	1	0.011	0.30	0.6052	
BC	5.625E-003	1	5.625E-003	0.15	0.7103	
A ²	1.78	1	1.78	47.89	0.0005	
B ²	0.61	1	0.61	16.52	0.0066	
C ²	0.025	1	0.025	0.67	0.4446	
Residual	0.22	6	0.037			
Lack of Fit	0.14	3	0.047	1.78	0.3241	Not sig.
Pure Error	0.080	3	0.027			
Cor Total	70.51	15				

การตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง (Model Adequacy Checking) เป็นการตรวจสอบความเหมาะสมและความถูกต้องของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ซึ่งมีสมมติฐานว่า รูปแบบของค่าส่วนตกค้าง (Residuals) ที่ได้จากข้อมูลในการทดลองต้องเป็นไปตามหลักการ $\varepsilon \sim NID(0, \sigma^2)$ คือ Residuals มีการแจกแจงแบบปกติและเป็นอิสระ

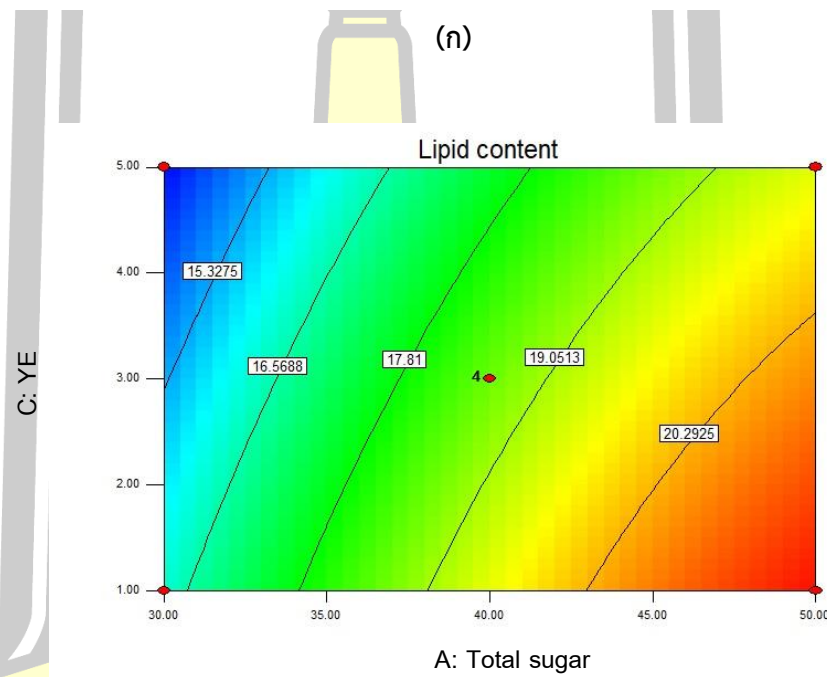
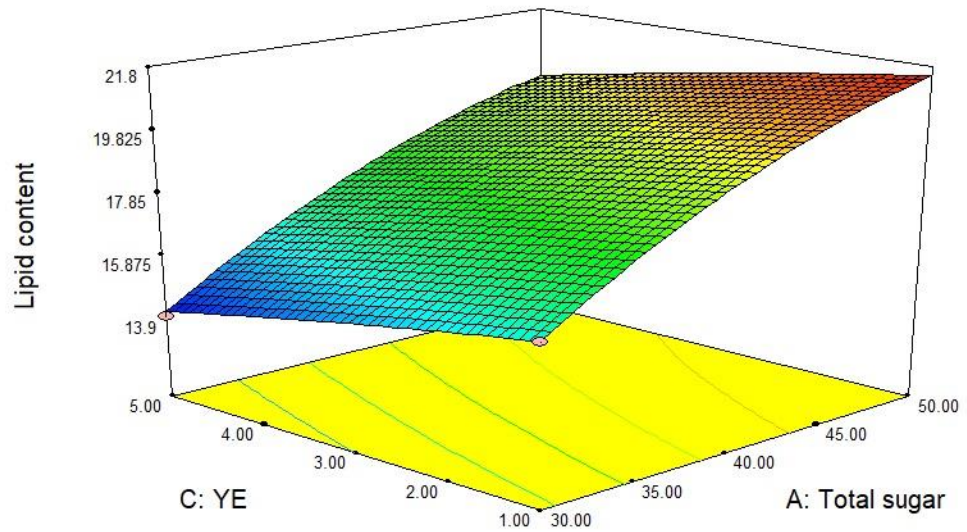
ด้วยค่าเฉลี่ยใกล้เคียง 0 และ σ^2 มีค่าคงตัว (Stability) จึงจะทำให้ข้อมูลจากการทดลองมีความถูกต้องและเชื่อถือได้ ผลการตรวจสอบความเป็นไปได้ตามข้อสมมติฐานแสดงดังต่อไปนี้

การตรวจสอบการกระจายว่า Residuals มีการแจกแจงเป็นแบบปกติ (Normal Distribution) โดยการพิจารณาการกระจายของค่า Residual จากภาพที่ 17 พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรงและจากการทดสอบด้วยวิธีของโคโมโกรอฟ-สเมียร์นอฟ นอร์มอลลิตีเทส (Kolmogorov-Smirnov Normality Test) ซึ่งมีค่า p-value > 0.05 ทำให้เชื่อมั่นได้ว่า Residuals มีการแจกแจงแบบปกติ

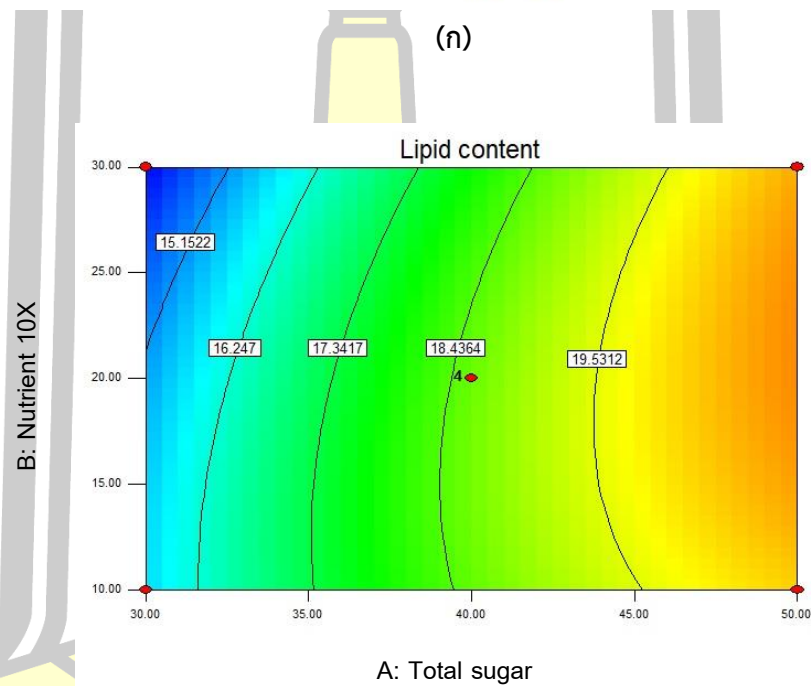
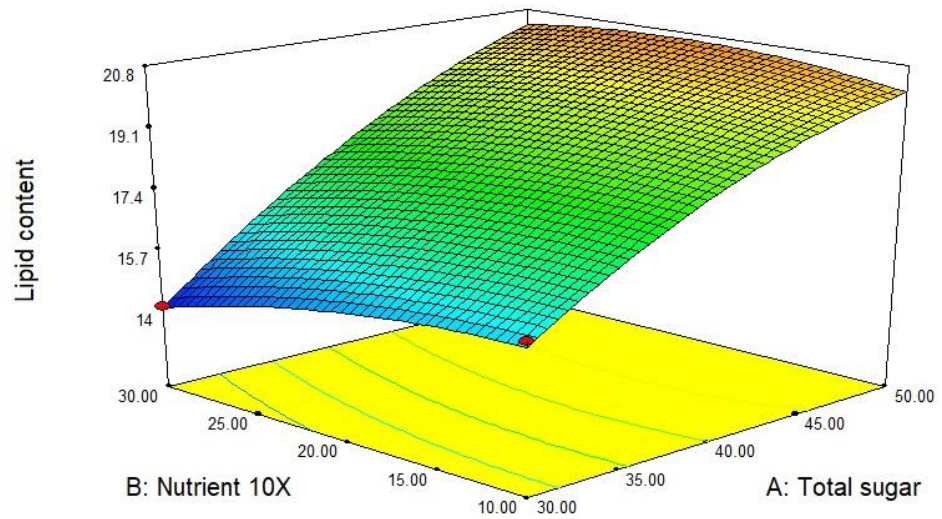


ภาพที่ 17 การกระจายแบบปกติของค่า Residual ของปริมาณน้ำมันของยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อย

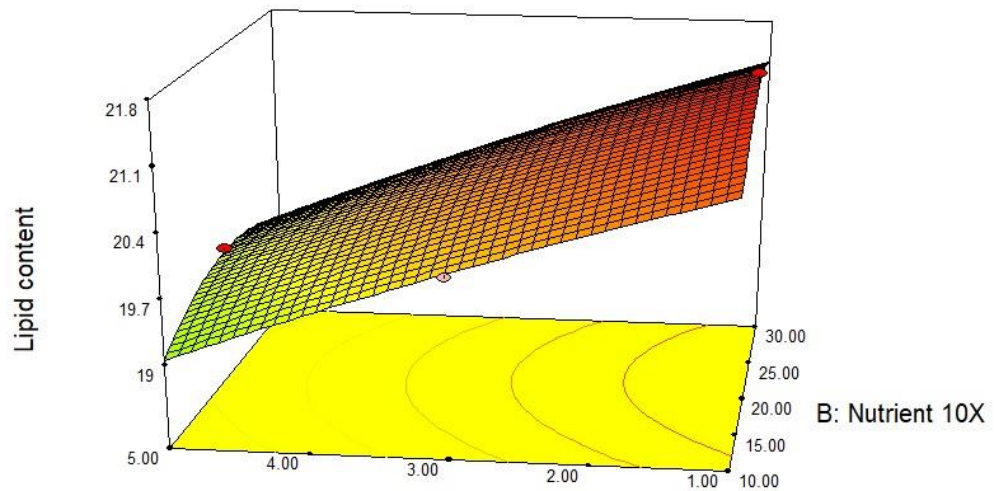
เมื่อได้สมการที่ 3 มาทำนายปริมาณไขมัน ประมวลผลด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองเป็นกราฟพื้นผิวตอบสนองและกราฟโครงร่างแสดงในภาพที่ 18-20 พบว่าปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่าที่ลดลง เมื่อพิจารณาตามสมการของปริมาณไขมันแล้วพบว่ามีค่าสูงที่สุดที่ได้ 21.85% ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อยที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 53.52 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 1.25 กรัมต่อลิตร และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 21.86 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร



ภาพที่ 18 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและสารสกัดจากยีสต์ของยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตชานอ้อย

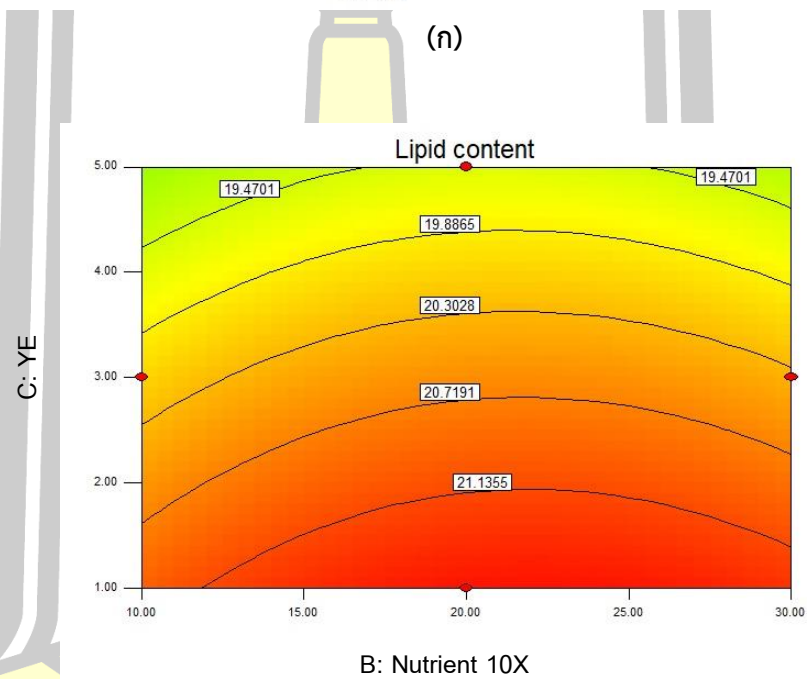


ภาพที่ 19 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่าง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ของยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตชานอ้อย



C: YE

(ก)

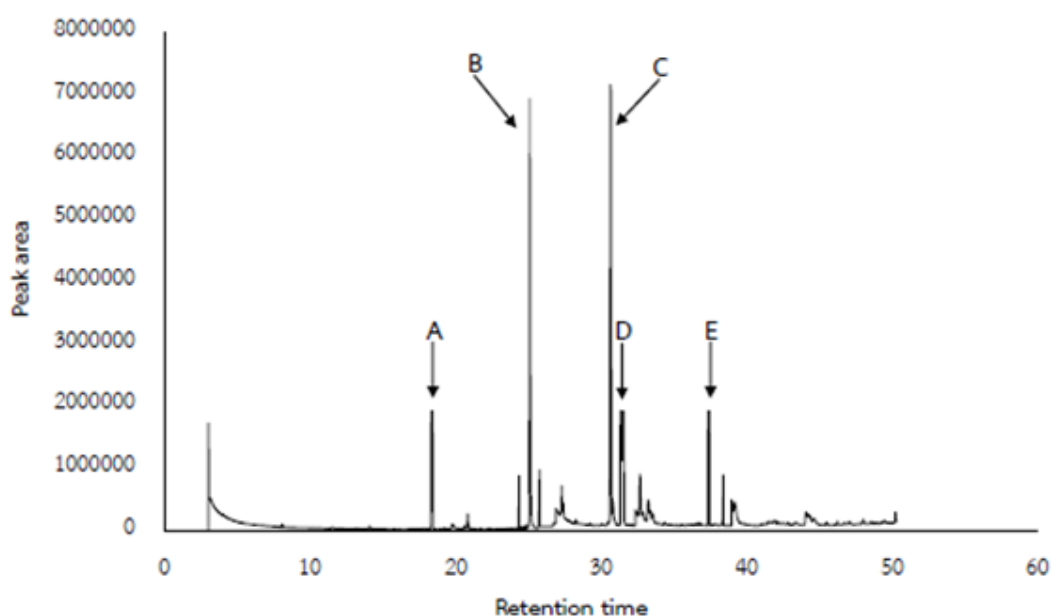


(ข)

ภาพที่ 20 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) ของปริมาณไขมันระหว่าง สารอาหารเข้มข้น 10 เท่าและสารสกัดจากยีสต์ ของยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตชานอ้อย

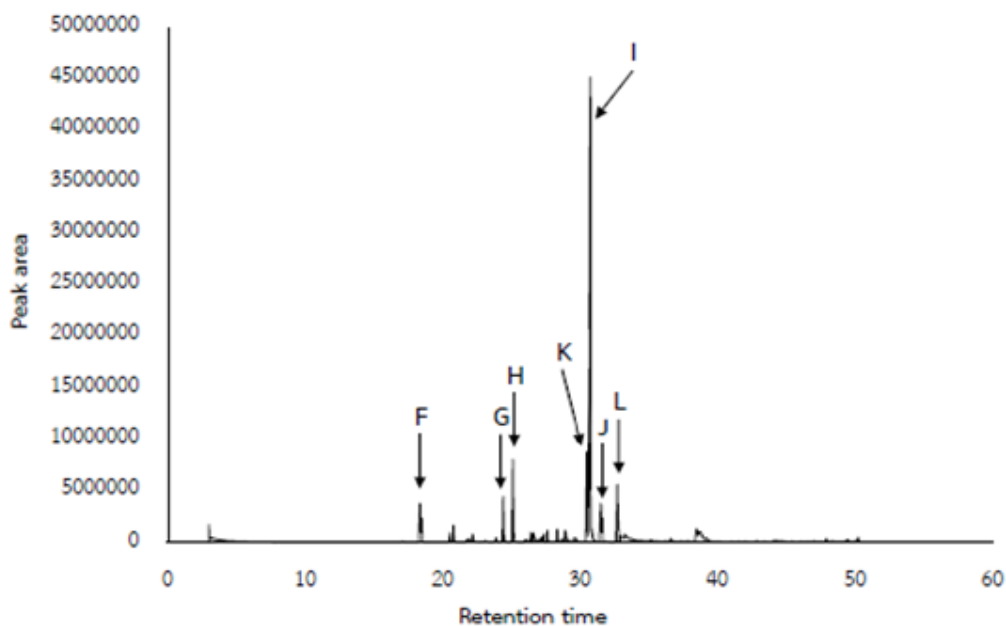
4.5 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของตัวอย่างไขมันรวม (crude lipid) มีความเข้มข้น 10,000 ppm ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังและชานอ้อยโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ตามลำดับ ด้วยวิธีเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas chromatograph-Mass spectrometer; GCMS) ดังแสดงในภาพที่ 21 และ 22 ตามลำดับ



ภาพที่ 21 โครมาโตแกรม GCMS ของกรดไขมันที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังโดยยีสต์ไอโซเลท MSU2





ภาพที่ 22 โครมาโตแกรม GCMS ของกรดไขมันที่ผลิตจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซท
ชานอ้อยโดยยีสต์ไอโซเลท Ka28

จากผลการวิเคราะห์สารด้วย GCMS ข้างต้นสามารถบ่งบอกโครงสร้างของกรดไขมัน
ที่ผลิตได้ และสามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดที่พบในไขมันรวม โดยเปรียบเทียบ
กับกราฟสารมาตรฐานกรดไขมันแต่ละชนิด ดังแสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 แสดงผลการวิเคราะห์กรดไขมันเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วย GCMS ที่ผลิต
ได้จากยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกาก
มันสำปะหลังและชานอ้อย

พีค	ค่า RT (นาที)	ปริมาณกรด ไขมัน (mg/g crude lipid)	ชนิดกรดไขมัน	สูตรเคมี
กรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท MSU2				
A	18.374	4.53	Myristic acid (Methyl tetradecanoate)	C14:0 (C ₁₅ H ₃₀ O ₂)

ตารางที่ 26 แสดงผลการวิเคราะห์กรดไขมันเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วย GCMS ที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังและชานอ้อย (ต่อ)

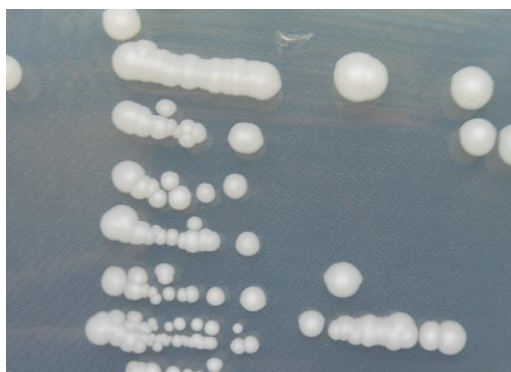
พีค	ค่า RT (นาที)	ปริมาณกรด ไขมัน (mg/g crude lipid)	ชนิดกรดไขมัน	สูตรเคมี
B	25.097	72.95	Palmitic acid (Methyl palmitate)	C16:0 (C ₁₇ H ₃₄ O ₂)
C	30.644	16.92	Oleic acid (cis-9-Oleic acid methyl ester)	C18:1 (C ₁₉ H ₃₆ O ₂)
D	31.45	4.74	Stearic acid (Methyl octadecenoate)	C18:0 (C ₁₉ H ₃₈ O ₂)
E	37.346	4.18	Arachidic acid (Methyl arachidate)	C20:0 (C ₂₁ H ₄₂ O ₂)
กรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท Ka28				
F	18.325	2.19	Myristic acid (Methyl tetradecanoate)	C14:0 (C ₁₅ H ₃₀ O ₂)
G	25.105	87.59	Palmitic acid (Methyl palmitate)	C16:0 (C ₁₇ H ₃₄ O ₂)
H	30.477	27.28	Linoleic acid (Methyl linoleate)	C18:2 (C ₁₉ H ₃₄ O ₂)
I	30.738	195.01	Oleic acid (cis-9-Oleic acid methyl ester)	C18:1 (C ₁₉ H ₃₆ O ₂)
J	31.462	44.16	Stearic acid (Methyl octadecenoate)	C18:0 (C ₁₉ H ₃₈ O ₂)

จากการเปรียบเทียบชนิดกรดไขมันกับสารมาตรฐานด้วย GCMS กรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท MSU2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซตกากมันสำปะหลังเป็นแหล่ง

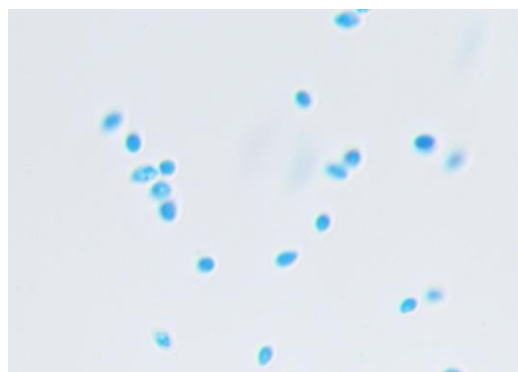
4.6 ผลการจัดจำแนกสกุลของยีสต์ทางอนุกรมวิธาน

4.6.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของไอโซเลท MSU2 และ Ka28 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MGYP พบว่าไอโซเลท MSU2 มีลักษณะโคโลนีกลม สีขาวใสรอบตรงกลางขาวขุ่น ขอบเรียบ (ภาพที่ 23ก) เมื่อศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีลักษณะเซลล์เป็นวงรี (ภาพที่ 23ข) ส่วนไอโซเลท Ka28 มีลักษณะโคโลนีกลม สีขาวใสรอบตรงกลางขาวขุ่น ขอบเรียบ (ภาพที่ 24ก) เมื่อศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีลักษณะเซลล์เป็นวงรี (ภาพที่ 24ข)



(ก)

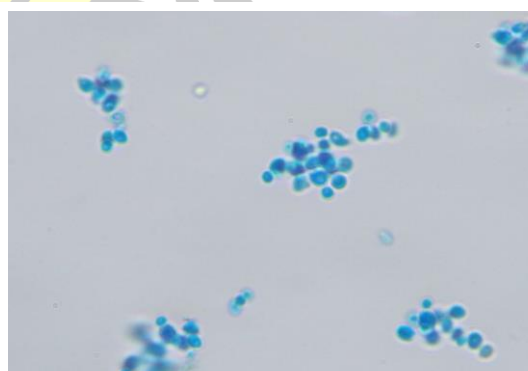


(ข)

ภาพที่ 23 ยีสต์ไอโซเลท MSU2 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MGYP (ข) ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า



(ก)



(ข)

ภาพที่ 24 ยีสต์ไอโซเลท Ka28 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MGYP (ข) ลักษณะรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.6.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

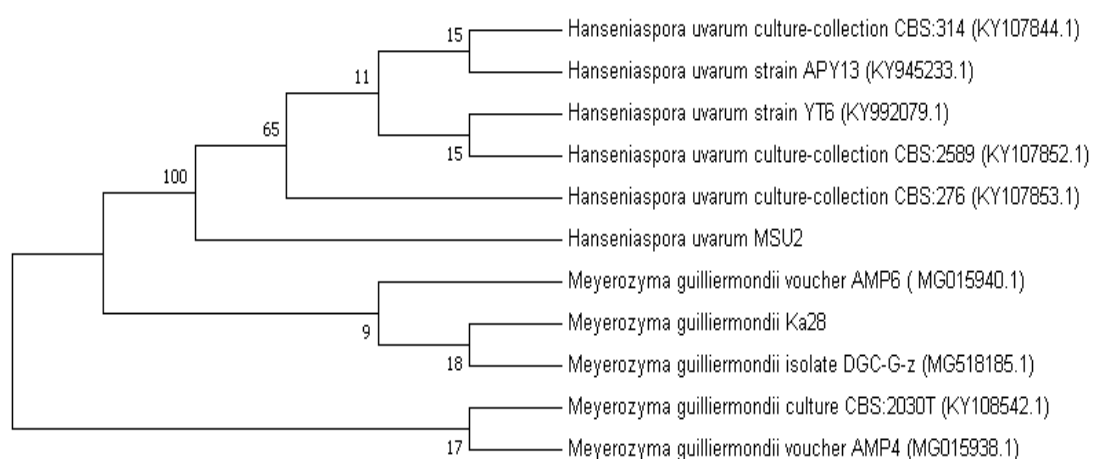
การจัดจำแนกสายพันธุ์ของไอโซเลทยีสต์ โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท MSU2 และ Ka28 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GeneBank ด้วยโปรแกรม BlastN (Basic local alignment search tools) จากฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) หรือความคล้าย (% similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์พบว่า

ยีสต์ไอโซเลท MSU2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ยาว 580 นิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'- AAACCAACTGGGATTACCTTAGTAACGGCGAGTGAAGC GGTAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAATT TGCTTTGATTAGGTCCTTGCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAAT CCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGG AATGCAGCTCAAAGTGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT AGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTA CGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTTG CCTCTCGTGGGCTTGGCCTCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAATTCTGGCAGCAG GATAAATCATTAGAATGTAGCTACTTCGGTAGTGTTATAGCTTTTTTGAATACTGTTAG CCGGATTGAGGACTGCGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGT CTTG -3'

ยีสต์ไอโซเลท Ka28 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ยาว 575 นิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'- AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGC GGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGATTG TAACCTTGGGGTTGGCTCTTGCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAA TCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGG GAATGCAGCTCTAAGTGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGA TAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGT ACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCC TTCGTGGCGGGGTGACCCGAGCTTATCGGGCCAGCATCGTTTTGGGCGGTAGGATAAT GGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCC

TAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCCCGTC
-3'

เมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 มาสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) และกำหนดแบบจำลองการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ด้วย Kimura-2-parameter model โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 ทำการทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรมด้วย Bootstrap test (ภาพที่ 25) ผลการวิเคราะห์พบว่ายีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Hanseniaspora uvarum* CBS:314 (KY107844.1) 99.8% และ *Meyerozyma guilliermondii* CBS:2030T (KY108542.1) 100% ตามลำดับ



ภาพที่ 25 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28

พหุบัณฑิต ชีวะ

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผล

จากการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดน้ำตาลในสารตั้งต้นไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อย พบปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 77.09 และ 50.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยในกากมันสำปะหลังเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังที่มีแป้งหลงเหลืออยู่สูงถึง 50-60% (Sriroth, Chollakup, Chotineeranat, Piyachomkwan, & Oates, 2000) เมื่อผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางจะพบน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 48.19 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kongkiattikajorn, Jirasak & Yoonan, (2006) ที่ทำการปรับสภาพเปลือกมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 55.99 กรัมต่อลิตร และพบปริมาณกลูโคสมากที่สุด ตามด้วยน้ำตาลไซโลส ส่วนชานอ้อยเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลซึ่งมีองค์ประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรต 60-70% (Vargas Betancur & Pereira, 2010) และเมื่อปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางจะพบน้ำตาลไซโลสมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 23.46 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vargas Betancur & Pereira (2010) ที่รายงานว่า การปรับสภาพชานอ้อยด้วยกรดเจือจางจะได้น้ำตาลไซโลสออกมาในปริมาณสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น การใช้กรดเจือจางเพื่อปรับสภาพวัตถุดิบที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจะเปลี่ยนวัตถุดิบพอลิกลีโนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลที่ละลายได้ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ แต่จะมีการปลดปล่อยสารพิษออกมาในปริมาณเล็กน้อย จึงตรวจพบสารพิษเพอร์ฟิวรัลในช่วง 0-0.30 กรัมต่อลิตร และไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรัล 0.30-0.37 กรัมต่อลิตร ในไฮโดรไลเซททั้งสองชนิด ซึ่งงานวิจัยนี้ไม่ได้กำจัดสารพิษเนื่องจากรายงานของ Yu, Zheng, Dorgan, & Chen (2011) ได้รายงานว่ายีสต์บางสายพันธุ์สามารถทนต่อสารพิษทั้งสองชนิดนี้ได้ถึง 1 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการคัดเลือกยีสต์จาก 32 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อย พบว่ามี 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 คัดแยกได้จากตัวอย่างดินตะกอนและตัวอย่างกากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ตามลำดับ ที่สามารถเจริญได้ดีบนไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อยตามลำดับ จึงคัดเลือกมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยใช้ไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและชานอ้อยเป็นสารตั้งต้น ซึ่งใช้แผนการทดลองแบบ Plackett-Burman เพื่อคัดเลือก 6 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แหล่งไนโตรเจน สารอาหารเข้มข้น 10 เท่า

ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น ปริมาณเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิ และใช้แผนการทดลองแบบ Box-Behnken เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจากปัจจัยหลักที่ได้โดยยีสต์ที่คัดเลือกได้

การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ไฮโซเลท MSU2 และ Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลังและขานอ้อย ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าไฮโซเลท MSU2 และ Ka28 สามารถเจริญและผลิตไขมันได้ดีในแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือ เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu, Zong, & Wu (2008) ที่รายงานผลการศึกษาศึกษาการผลิตไขมันโดยยีสต์ *Trichosporon fermentans* จากกากน้ำตาลที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง และทำการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ผลการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์อย่างยูเรียจะส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด แต่ได้ปริมาณไขมันต่ำ ในขณะที่เปปโตนที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จะพบการเจริญของเชื้อน้อยกว่าแต่พบการผลิตไขมันสูงถึง 54.9% ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จึงมีผลในการส่งเสริมการสะสมไขมันในเซลล์ได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์สะสมไขมันไฮโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman มีปัจจัยที่นำมาศึกษาทั้งสิ้น 6 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของเปปโตน สารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิ พบว่ามี 3 ปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.05$ คือ ความเป็นกรดต่าง ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิ โดยความเป็นกรดต่าง และปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น ส่งผลในทางบวกต่อการผลิตไขมัน ส่วนอุณหภูมิส่งผลกระทบทางลบ โดยมีปริมาณไขมันสูงสุด 33.73% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang et al. (2012) ที่รายงานเกี่ยวกับปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตไขมันของยีสต์ *Trichosporon fermentans* คือ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น และเวลา โดยใช้ไฮโดรไลเซทขานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันด้วยวิธีการแบบพื้นผิวตอบสนอง จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันของยีสต์ไฮโซเลท MSU2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทกากมันสำปะหลัง จากทั้ง 3 ปัจจัย ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken วางแผนการทดลองได้ 16 แผนการทดลอง ซึ่งได้ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 34.59% จากนั้นนำค่าการผลิตไขมันที่ได้จาก 16 แผนการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ได้สมการการผลิตไขมันดังนี้

$$Y = 33.95 - 3.75*A + 2.62*B - 2.79*C - 0.65*AB - 3.32*AC - 2.27*BC - 3.16*A^2 - 8.00*B^2 - 6.60*C^2$$

โดยกำหนดให้ Y คือ ค่าการตอบสนองปริมาณไขมัน, A แทนค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้น, B แทนปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และ C แทนอุณหภูมิ จากสมการข้างต้นนำไปหากราฟพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งสามารถหาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันได้ดังนี้ ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 22.84% และอุณหภูมิเท่ากับ 26.28 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 34.56%

การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์สะสมไขมันไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อย ด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman มีปัจจัยที่นำมาศึกษาทั้งสิ้น 6 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ สารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ความเป็นกรดต่าง ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิ พบว่ามี 3 ปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.05$ คือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ส่งผลในทางบวกต่อการผลิตไขมัน ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ส่งผลกระทบทางลบ โดยมีปริมาณไขมันสูงสุด 20.41% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liang & Jiang (2013) ที่รายงานเกี่ยวกับกระบวนการผลิตไขมันโดยยีสต์สะสมไขมันในสถานะที่มีแหล่งคาร์บอนจำนวนมากและมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนจำกัด โดยยีสต์จะมีการเจริญเติบโตโดยใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและเริ่มมีการสะสมไขมันในเซลล์เมื่อแหล่งไนโตรเจนถูกใช้หมดไป จากนั้นศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันของยีสต์ไอโซเลท Ka28 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไฮโดรไลเซทชานอ้อย จากทั้ง 3 ปัจจัย ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken วางแผนการทดลองได้ 16 แผนการทดลอง ซึ่งได้ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 21.70% จากนั้นนำค่าการผลิตไขมันที่ได้จาก 16 แผนการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ได้สมการผลิตไขมันดังนี้

$$Y = 21.29 + 8.750E-003*A + 0.61*B - 0.95*C + 0.47*AB + 0.052*AC - 0.038*BC - 0.67*A^2 - 0.39*B^2 - 0.079*C^2$$

โดยกำหนดให้ Y คือ ค่าการตอบสนองปริมาณไขมัน, กำหนดให้ A แทนปริมาณน้ำตาลทั้งหมด, B แทนความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ และ C แทนสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า จากสมการข้างต้นนำไปหากราฟพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งสามารถหาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิต

ไขมันได้ดังนี้ น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 53.52 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 1.25 กรัมต่อลิตร และสารอาหารเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 21.86 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร จะให้ปริมาณไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 21.85%

ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 โดยใช้ไฮโดรไลเซทจากมันสำปะหลังและชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ พบกรดไขมันหลักคือ กรดโอเลอิก ซึ่งมีปริมาณ 48.77 และ 63.03% จากปริมาณกรดไขมันที่ตรวจพบทั้งหมด สอดคล้องกับรายงานของ Meng et al. (2009) ที่รายงานว่ากรดไขมันเด่นที่พบจากการผลิตโดยยีสต์จะมีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ C16-C18 โดยเฉพาะกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 พันธะ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yu, Zeng, Zheng, & Chen (2014) รายงานเกี่ยวกับการผลิตไขมันโดยยีสต์ *Cryptococcus curvatus* ที่ใช้กลูโคสและไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการแปรผันความเข้มข้นของเฟอร์ฟูรัล พบว่า *C. curvatus* มีความมีความทนต่อสารพิษที่เติมลงไป โดยผลิตไขมันสูงที่มีองค์ประกอบกรดไขมันหลักเป็นกรดโอเลอิก นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chatzifragkou et al. (2011) ที่ศึกษาการผลิตไขมันโดยยีสต์และราสะสมไขมัน พบว่ายีสต์สะสมไขมันที่ทำการศึกษาคือจะผลิตกรดไขมันเด่น คือกรดโอเลอิก ตามด้วยกรดปาล์มมาติก ซึ่งปริมาณจะขึ้นกับสายพันธุ์และเวลาในการเพาะเลี้ยง เช่น *Candida oleophila* จะผลิตกรดโอเลอิกเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ในขณะที่กรดสเตียริกจะมีปริมาณลดลง หรือยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนานขึ้น จะพบปริมาณกรดปาล์มมาติกและกรดสเตียริกลดลง ในขณะที่กรดปาล์มไมโตเลอิกและกรดลิโนเลอิกจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์โดยศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของยีสต์ไอโซเลท MSU2 และ Ka28 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Hanseniaspora uvarum* CBS 314T (KY107844) 99.8% และ *Meyerozyma guilliermondii* 100% ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามปริมาณไขมันและชนิดของกรดไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์จะแตกต่างกัน ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของยีสต์ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน รวมถึงสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เป็นต้น (ตารางที่ 28) นอกจากนี้ไขมันที่ผลิตได้จากยีสต์ยังมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับที่ผลิตได้จากพืช (Zhu et al., 2008; Meng et al., 2009) จึงเป็นสารตั้งต้นไขมันที่สำคัญในการที่จะพัฒนาไปสู่การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่ายีสต์ที่คัดแยกได้สามารถผลิตไขมันโดยใช้ไฮโดรไลเซททางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมทางการเกษตร อันเป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณมากในประเทศเกษตรกรรมเป็นสารตั้ง

ต้นทุนราคาถูก และยังสามารถผลิตกรดไขมันที่มีโครงสร้างคล้ายกับน้ำมันพืชที่สามารถพัฒนาไปสู่การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ต่อไปในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากกระบวนการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดจะมีสารพิษจากกระบวนการไฮโดรไลซิสเกิดขึ้น และถึงแม้จะมีรายงานว่ายีสต์สามารถทนสารพิษที่เกิดขึ้นได้ แต่ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงขีดความสามารถในการทนต่อสารพิษที่เกิดขึ้นต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้ต่อไป

5.2.2 จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์คือต้องมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป และมีแหล่งไนโตรเจนจำกัด แต่เนื่องจากข้อจำกัดของปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเซต จึงควรศึกษาการเติมแหล่งน้ำตาลที่มีความเข้มข้นมากกว่านี้ ตลอดจนศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการผลิตไขมันโดยยีสต์สะสมไขมันที่คัดเลือกได้ต่อไป

5.2.3 เนื่องจากยีสต์สามารถเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ได้ตามองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยง จึงควรศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมัน เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันที่มีคุณสมบัติต่อการนำไปพัฒนาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด

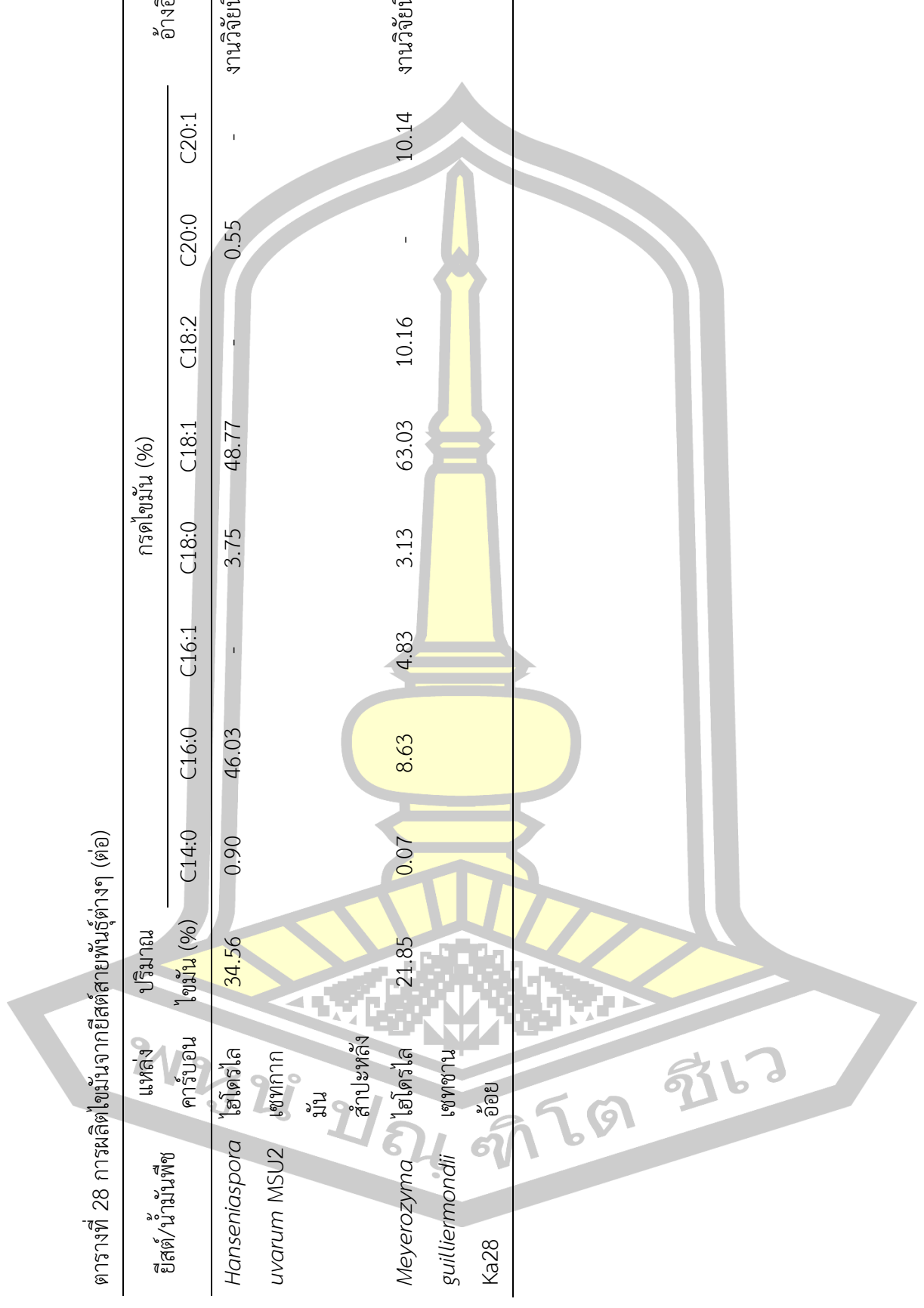


ตารางที่ 28 การผลิตไขมันจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

ยีสต์/น้ำมันพืช	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณไขมัน (%)										อ้างอิง
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1			
ปาล์ม	-	0.6-2.4	32-46.3	-	4-6.3	37-53	6-12	-	-	-	-	Huang et al. (2012)
มะกอก	-	1.3	7-18.3	-	1.4-3.3	55.5-84.5	4-19	-	-	-	-	Huang et al. (2012)
เมล็ดคั่วถั่ว	-	-	4-8	-	2.3-8	73.6-79	11-19	-	-	-	-	Huang et al. (2012)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	ไฮโดรไลเซทซิ่งข้าวโพด	-	37.7	4.8	5.1	48.1	2.3	-	-	-	-	Huang, Chen, Yang, et al. (2013)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ไฮโดรไลเซทฟางข้าวสาลี	-	25.9	-	15.2	47.7	6.42	-	-	-	-	Yu et al. (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	ไฮโดรไลเซทฟางข้าวสาลี	-	23.5	-	9.0	43.4	15.4	-	-	-	-	Yu et al. (2011)

ตารางที่ 28 การผลิตไขมันจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ (ต่อ)

ยีสต์/น้ำมันพืช	แหล่ง คาร์บอน	ปริมาณ ไขมัน (%)	กรดไขมัน (%)										อ้างอิง		
			C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C20:				
<i>Hanseniaspora</i>	ไฮโดรไล	34.56	0.90	46.03	-	3.75	48.77	-	0.55	-	-	-	-	-	งานวิจัยนี้
<i>uvarum</i> MSU2	เซพทาก มัน														
<i>Meyerozyma</i>	สำหรับเลี้ยง	21.85	0.07	8.63	4.83	3.13	63.03	10.16	-	-	-	-	10.14	งานวิจัยนี้	
<i>guilliermondii</i>	เซพทาก														
Ka28	อ้อย														



บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ, & ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2544). *จุลชีววิทยาทั่วไป*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นวรรตน์ จันทรกระเวณ. (2548). *การออกแบบการทดลองเพื่อปรับปรุงคุณภาพของแรงเหวี่ยงลูกบอล ในกระบวนการเชื่อมวงจร: กรณีศึกษาโรงงานผลิตเซมิคอนดักเตอร์*. วิทยานิพนธ์ปริญญา วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัชพล พะวงศ์รัตน์. (2558). ศักยภาพและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรประเภท ลิกโนเซลลูโลสเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพ. *วารสารวิชาการปทุมวัน*, 14, 67–78.
- รัตนภรณ์ ลิสิงห์. (2551). *การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิดสกุล Chlorella ที่ คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำจืดในจังหวัดขอนแก่น*. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ.
- ศศิธร ไกรฤทธิชัย. (2552). *การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อ การย่อยสลายใบไม้*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศิริพรรณ จันทรน้ำท่วม. (2557). *การคัดแยก Botryococcus braunii และการศึกษาสภาวะที่ เหมาะสมในการผลิตไฮโดรคาร์บอน*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ansari, E., & Hughes, R. (2016). Response surface method for assessing energy production from geopressed geothermal reservoirs. *Geothermal Energy*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40517-016-0057-5>
- Araujo, G. S., Matos, L. J. B. L., Gonçalves, L. R. B., Fernandes, F. A. N., & Farias, W. R. L. (2011). Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*, 102(8), 5248–5250.
- Araujo, G. S., Matos, L. J. B. L., Gonçalves, L. R. B., Fernandes, F. A. N., Farias, W. R. L., Roux, J. M., ... Bressler, D. C. (2016). Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology*, 102(8), 65–71.
- Bastawde, K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 353–368.

- Brar, K. K., Sarma, A. K., Aslam, M., Polikarpov, I., & Chadha, B. S. (2017). Potential of oleaginous yeast *Trichosporon* sp., for conversion of sugarcane bagasse hydrolysate into biodiesel. *Bioresource Technology*, *242*, 161–168.
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., ... Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, *36*(2), 1097–1108.
- Chen, X. F., Huang, C., Yang, X. Y., Xiong, L., Chen, X. De, & Ma, L. L. (2013). Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. *Bioresource Technology*, *143*, 18–24.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, *26*(3), 126–131.
- Chung, J., Lee, I., & Han, J. I. (2016). Biodiesel production from oleaginous yeasts using livestock wastewater as nutrient source after phosphate struvite recovery. *Fuel*, *186*, 305–310.
- Cortes, M. A. L. R. M., & de Carvalho, C. C. C. R. (2015). Effect of carbon sources on lipid accumulation in *Rhodococcus* cells. *Biochemical Engineering Journal*, *94*, 100–105.
- Dey, P., Banerjee, J., & Maiti, M. K. (2011). Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates - *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, *102*(10), 5815–5823.
- Doshi, A., & Karolia, A. (2016). Optimization of Enzyme Treatment for Banana Fiber. *International Journal of Textile and Fashion Technology*, *6*(2), 1–8.
- Dünahay, T. G., Jarvis, E. E., Zeiler, K. G., Roessler, P. G., & Brown, L. M. (1992). Genetic engineering of microalgae for fuel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *34*, 331–339.
- Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R., & Ander, P. (1990). *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Component*. Berlin: Springer Verlag.

- Espinosa-Gonzalez, I., Asomaning, J., Mussone, P., & Bressler, D. C. (2014). Two-step thermal conversion of oleaginous microalgae into renewable hydrocarbons. *Bioresource Technology*, *158*, 91–97.
- Feng, D., Chen, Z., Xue, S., & Zhang, W. (2011). Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology*, *102*(12), 6710–6716.
- Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., & Compagno, C. (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*, *111*, 398–403.
- Goswami, L., Tejas Namboodiri, M. M., Vinoth Kumar, R., Pakshirajan, K., & Pugazhenthii, G. (2017). Biodiesel production potential of oleaginous *Rhodococcus opacus* grown on biomass gasification wastewater. *Renewable Energy*, *105*, 400–406.
- Gouda, M. K., Omar, S. H., & Aouad, L. M. (2008). Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(9), 1703–1711.
- Guo, F., Wang, H., Wang, J., Zhou, W., Gao, L., Chen, L., ... Liu, T. (2014). Special biochemical responses to nitrogen deprivation of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. *Bioresource Technology*, *158*, 19–24.
- Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, *28*(4), 384–410.
- He, Q., Yang, H., & Hu, C. (2016). Culture modes and financial evaluation of two oleaginous microalgae for biodiesel production in desert area with open raceway pond. *Bioresource Technology*, *218*, 571–579.
- He, Q., Yang, H., Wu, L., & Hu, C. (2015). Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, *191*, 219–228.
- Hu, C., Zhao, X., Zhao, J., Wu, S., & Zhao, Z. K. (2009). Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, *100*(20), 4843–4847.

- Huang, C., Chen, X. fang, Xiong, L., Yang, X. yan, Chen, X. de, Ma, L. long, & Chen, Y. (2013). Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Biomass and Bioenergy*, *49*(2), 273–278.
- Huang, C., Chen, X., Yang, X., Xiong, L., Lin, X., Yang, J., ... Chen, X. (2013). Bioconversion of Corncob Acid Hydrolysate into Microbial Oil by the Oleaginous Yeast *Lipomyces starkeyi*, (2). <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0651-y>
- Huang, C., Wu, H., Li, R. feng, & Zong, M. hua. (2012). Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology. *New Biotechnology*, *29*(3), 372–378.
- Hui, W., Wenjun, Z., Wentao, C., Lili, G., & Tianzhong, L. (2016). Strategy study on enhancing lipid productivity of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema*. *Bioresource Technology*, *218*, 161–166.
- Johnravindar, D., Karthikeyan, O. P., Selvam, A., Murugesan, K., & Wong, J. W. C. (2018). Lipid accumulation potential of oleaginous yeasts: A comparative evaluation using food waste leachate as a substrate. *Bioresource Technology*, *248*, 221–228.
- Karatay, S. E., & Dönmez, G. (2010). Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource Technology*, *101*(20), 7988–7990.
- Kongkiattakajorn, Jirasak & Yoonan, K. (2006). Conversion of Cassava Industry Waste to Fermentable Sugars. *Sustainable Energy and Environment*, *031*(November), 31–21. Retrieved from <http://www.jgsee.kmutt.ac.th/see1/cd/file/E-031.pdf>
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *73*(4), 331–371.
- Li, D. W., Cen, S. Y., Liu, Y. H., Balamurugan, S., Zheng, X. Y., Alimujiang, A., ... Li, H. Y. (2016). A type 2 diacylglycerol acyltransferase accelerates the triacylglycerol biosynthesis in heterokont oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Journal of Biotechnology*, *229*, 65–71.

- Liang, M. H., & Jiang, J. G. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 395–408.
- Liang, Y., Cui, Y., Trushenski, J., & Blackburn, J. W. (2010). Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 101(19), 7581–7586.
- Liang, Y., Jarosz, K., Wardlow, A. T., Zhang, J., & Cui, Y. (2014). Lipid production by *Cryptococcus curvatus* on hydrolysates derived from corn fiber and sweet sorghum bagasse following dilute acid pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(8), 2086–2098.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34(1), 1–5.
- Miao, X. L., & WU, Q. Y. (2004). Bio-oil fuel production from microalgae after heterotrophic growth. *Renewable Energy*, 4(4), 41–44.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Youngblood, J. (2011). *Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites*. *Chemical Society Reviews* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>
- Patel, A., Arora, N., Sartaj, K., Pruthi, V., & Pruthi, P. A. (2016). Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 62, 836–855.
- Patel, A., Sartaj, K., Arora, N., Pruthi, V., & Pruthi, P. A. (2017). Biodegradation of phenol via meta-cleavage pathway triggers de novo TAG biosynthesis pathway in oleaginous yeast. *Journal of Hazardous Materials*, 340, 47–56.
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, 33(4), 305–325.

- Poontawee, R., Yongmanitchai, W., & Limtong, S. (2017). Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. *Process Biochemistry*, *53*, 44–60.
- Ramírez-Castrillón, M., Jaramillo-García, V. P., Rosa, P. D., Landell, M. F., Vu, D., Fabricio, M. F., ... Valente, P. (2017). The oleaginous yeast *Meyerozyma guilliermondii* BI281A as a new potential biodiesel feedstock: Selection and lipid production optimization. *Frontiers in Microbiology*, *8*(SEP).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01776>
- Ratlidge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, *86*(11), 807–815.
- Rattray, J. B. M., Schibeci, A., & Kidby, D. K. (1975). Lipids of Yeasts. *Bacteriological Reviews*, *39*(3), 197–231.
- Ruan, Z., Zanotti, M., Archer, S., Liao, W., & Liu, Y. (2014). Oleaginous fungal lipid fermentation on combined acid- and alkali-pretreated corn stover hydrolysate for advanced biofuel production. *Bioresource Technology*, *163*, 12–17.
- Ruan, Z., Zanotti, M., Archer, S., Liao, W., Liu, Y., Bhanja, A., ... Maiti, M. K. (2014). Comparative Studies of Oleaginous Fungal Strains (*Mucor circinelloides* and *Trichoderma reesei*) for Effective Wastewater Treatment and Bio-Oil Production. *Bioresource Technology*, *102*(10), 12–17.
- Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (2005). Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7.
- Sankh, S., Thiru, M., Saran, S., & Rangaswamy, V. (2013). Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel*, *106*, 690–696.
- Sengmee, D., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Prasertsan, P. (2017). Biophotolysis-based hydrogen and lipid production by oleaginous microalgae using crude glycerol as exogenous carbon source. *International Journal of Hydrogen Energy*, *42*(4), 1970–1976.

- Shields-Menard, S. A., AmirSadeghi, M., Green, M., Womack, E., Sparks, D. L., Blake, J., French, T. (2017). The effects of model aromatic lignin compounds on growth and lipid accumulation of *Rhodococcus rhodochrous*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 121, 79–90.
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., & Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 713–728.
- Srinuanpan, S., Cheirsilp, B., Kittha, W., & Prasertsan, P. (2017). Strategies to improve methane content in biogas by cultivation of oleaginous microalgae and the evaluation of fuel properties of the microalgal lipids. *Renewable Energy*, 113, 1229–1241.
- Sriroth, K., Chollakup, R., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., & Oates, C. G. (2000). Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bioresource Technology*, 71(1), 63–69.
- Tampitak, S., Louhasakul, Y., Cheirsilp, B., & Prasertsan, P. (2015). Lipid Production from Hemicellulose and Holocellulose Hydrolysate of Palm Empty Fruit Bunches by Newly Isolated Oleaginous Yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(6), 1801–1814.
- Tariq, M., Ali, S., Ahmad, F., Ahmad, M., Zafar, M., Khalid, N., & Khan, M. A. (2011). Identification, FT-IR, NMR (¹H and ¹³C) and GC/MS studies of fatty acid methyl esters in biodiesel from rocket seed oil. *Fuel Processing Technology*, 92(3), 336–341.
- Thabet, H. M., Pasha, C., Ahmed, M., & Linga, V. R. (2012). Isolation of Novel Lipase Producing *Sporobolomyces salmonicolor* OVS8 from Oil Mill Spillage and Enhancement of Lipase Production, 5(4), 301–306.
- Thawechai, T., Cheirsilp, B., Louhasakul, Y., Boonsawang, P., & Prasertsan, P. (2016). Mitigation of carbon dioxide by oleaginous microalgae for lipids and pigments production: Effect of light illumination and carbon dioxide feeding strategies. *Bioresource Technology*, 219, 139–149.

- Tsigie, Y. A., Wang, C. Y., Truong, C. T., & Ju, Y. H. (2011). Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, 102(19), 9216–9222.
- Vargas Betancur, G. J., & Pereira, N. (2010). Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(3), 1–9.
- Vyas, S., & Chhabra, M. (2017). Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast. *Bioresource Technology*, 223, 250–258.
- Wells, T., Wei, Z., & Ragauskas, A. (2015). Bioconversion of lignocellulosic pretreatment effluent via oleaginous *Rhodococcus opacus* DSM 1069. *Biomass and Bioenergy*, 72, 200–205.
- Wright, J. D. (1988). Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Progress*, 84(8), 62–74.
- Xavier, M. C. A., Coradini, A. L. V., Deckmann, A. C., & Franco, T. T. (2017). Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochemical Engineering Journal*, 118, 11–19.
- Xia, L., Ge, H., Zhou, X., Zhang, D., & Hu, C. (2013). Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. *Bioresource Technology*, 144, 261–267.
- Yachmenev, V., Condon, B., Klasson, T., & Lambert, A. (2009). Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(1), 25–31.
- Yu, X., Zeng, J., Zheng, Y., & Chen, S. (2014). Effect of lignocellulose degradation products on microbial biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Process Biochemistry*, 49(3), 457–465.
- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M., & Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*, 102(10), 6134–6140.

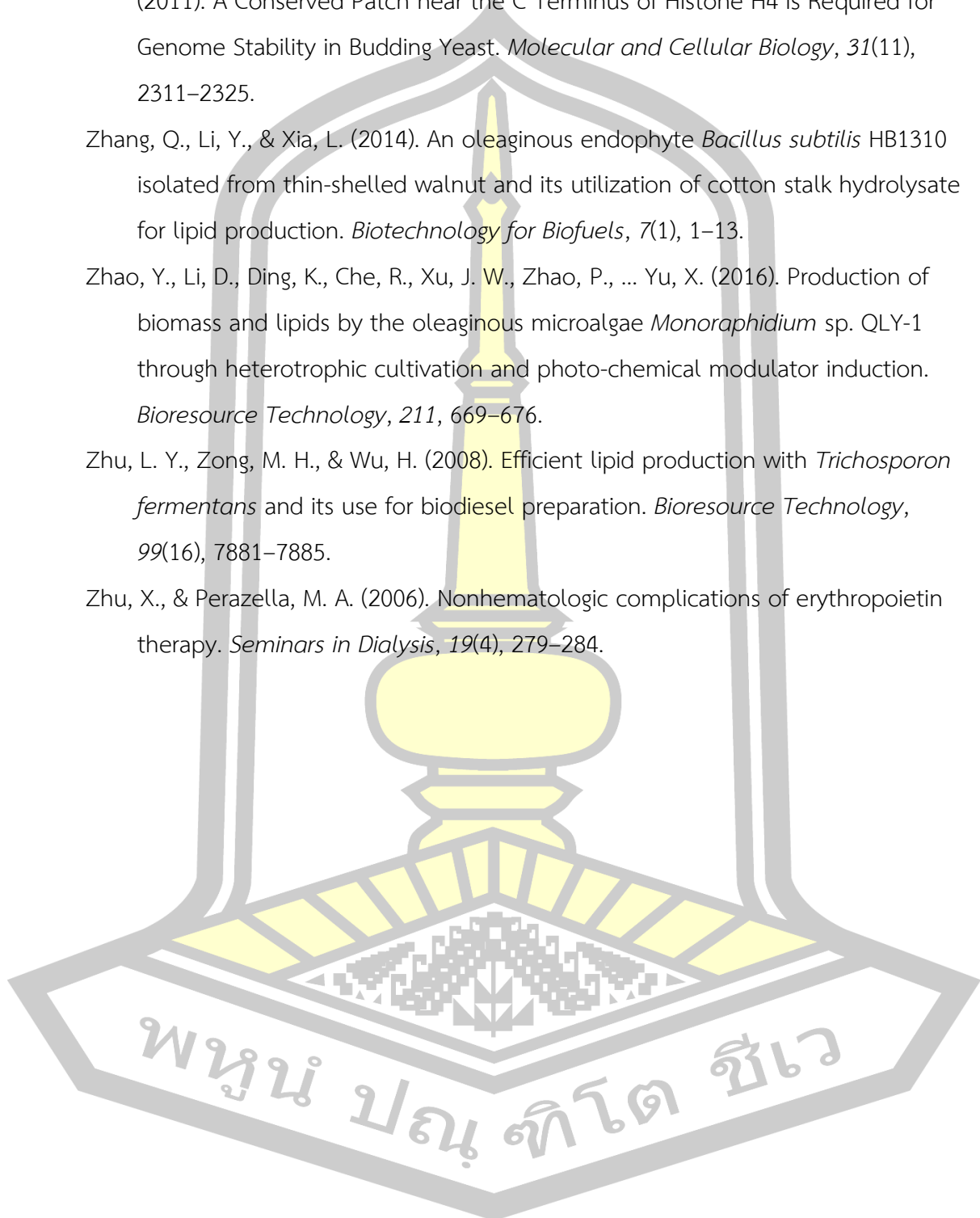
Yu, Y., Srinivasan, M., Nakanishi, S., Leatherwood, J., Shilatifard, A., & Sternglanz, R. (2011). A Conserved Patch near the C Terminus of Histone H4 Is Required for Genome Stability in Budding Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 31(11), 2311–2325.

Zhang, Q., Li, Y., & Xia, L. (2014). An oleaginous endophyte *Bacillus subtilis* HB1310 isolated from thin-shelled walnut and its utilization of cotton stalk hydrolysate for lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–13.

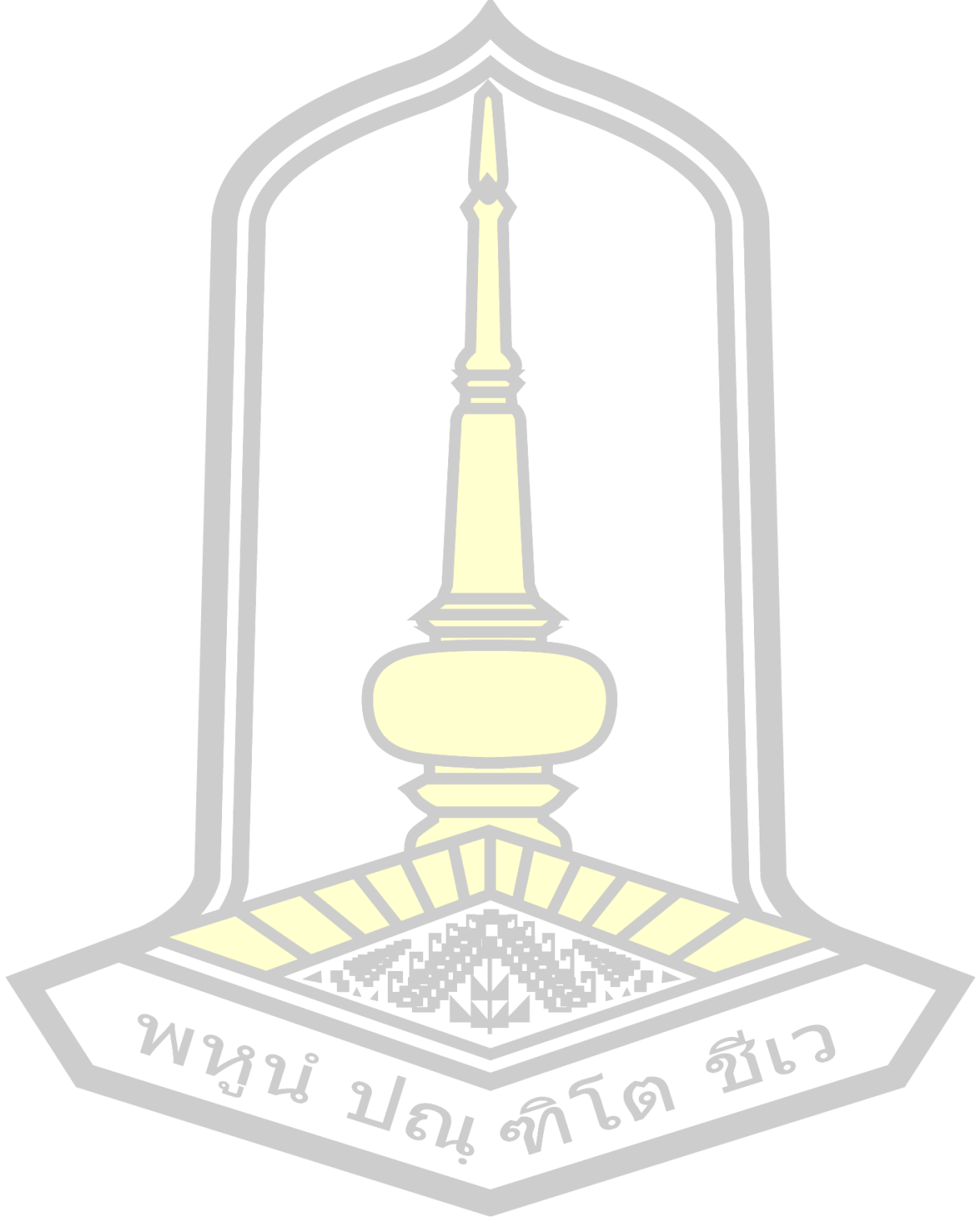
Zhao, Y., Li, D., Ding, K., Che, R., Xu, J. W., Zhao, P., ... Yu, X. (2016). Production of biomass and lipids by the oleaginous microalgae *Monoraphidium* sp. QLY-1 through heterotrophic cultivation and photo-chemical modulator induction. *Bioresource Technology*, 211, 669–676.

Zhu, L. Y., Zong, M. H., & Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99(16), 7881–7885.

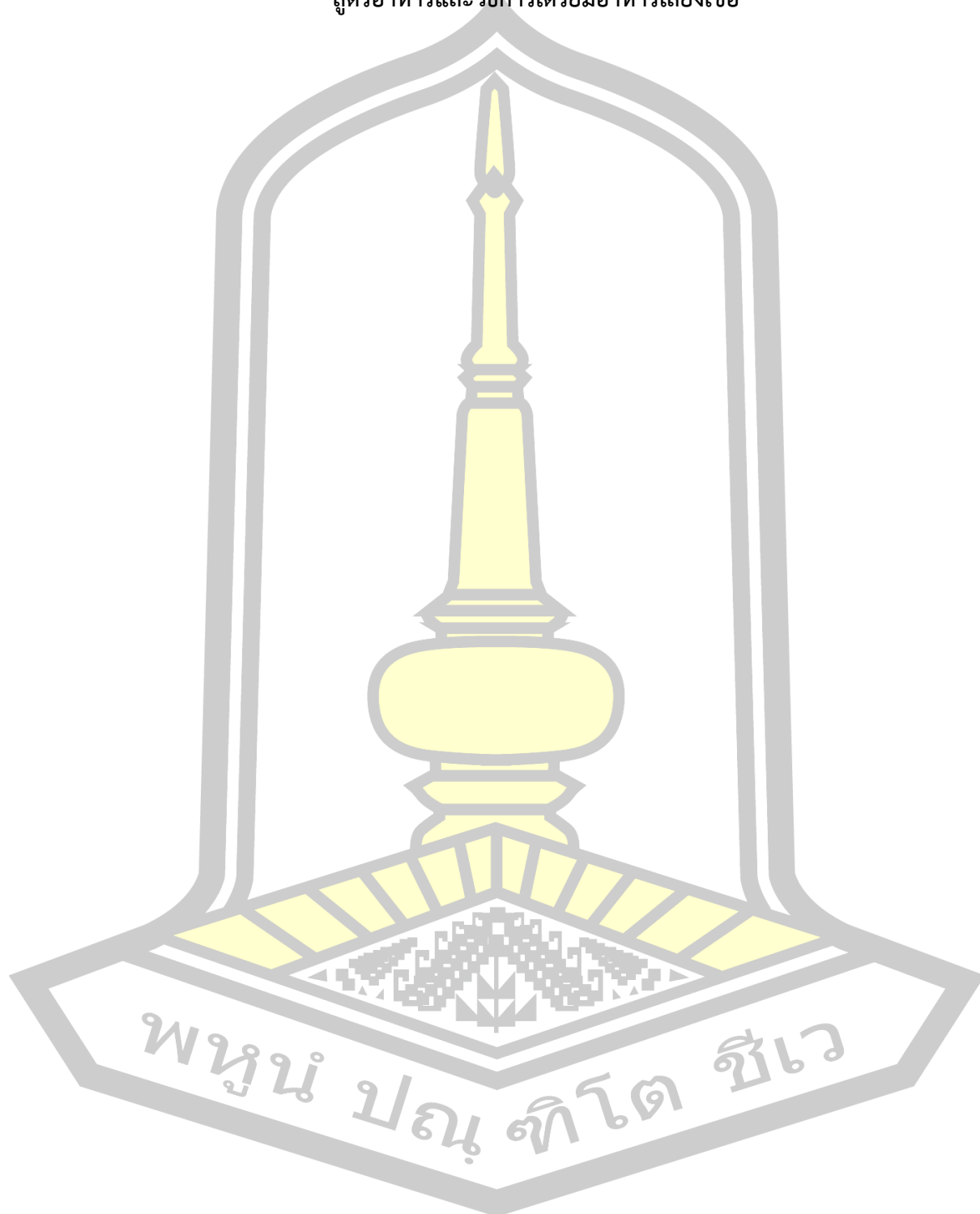
Zhu, X., & Perazella, M. A. (2006). Nonhematologic complications of erythropoietin therapy. *Seminars in Dialysis*, 19(4), 279–284.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

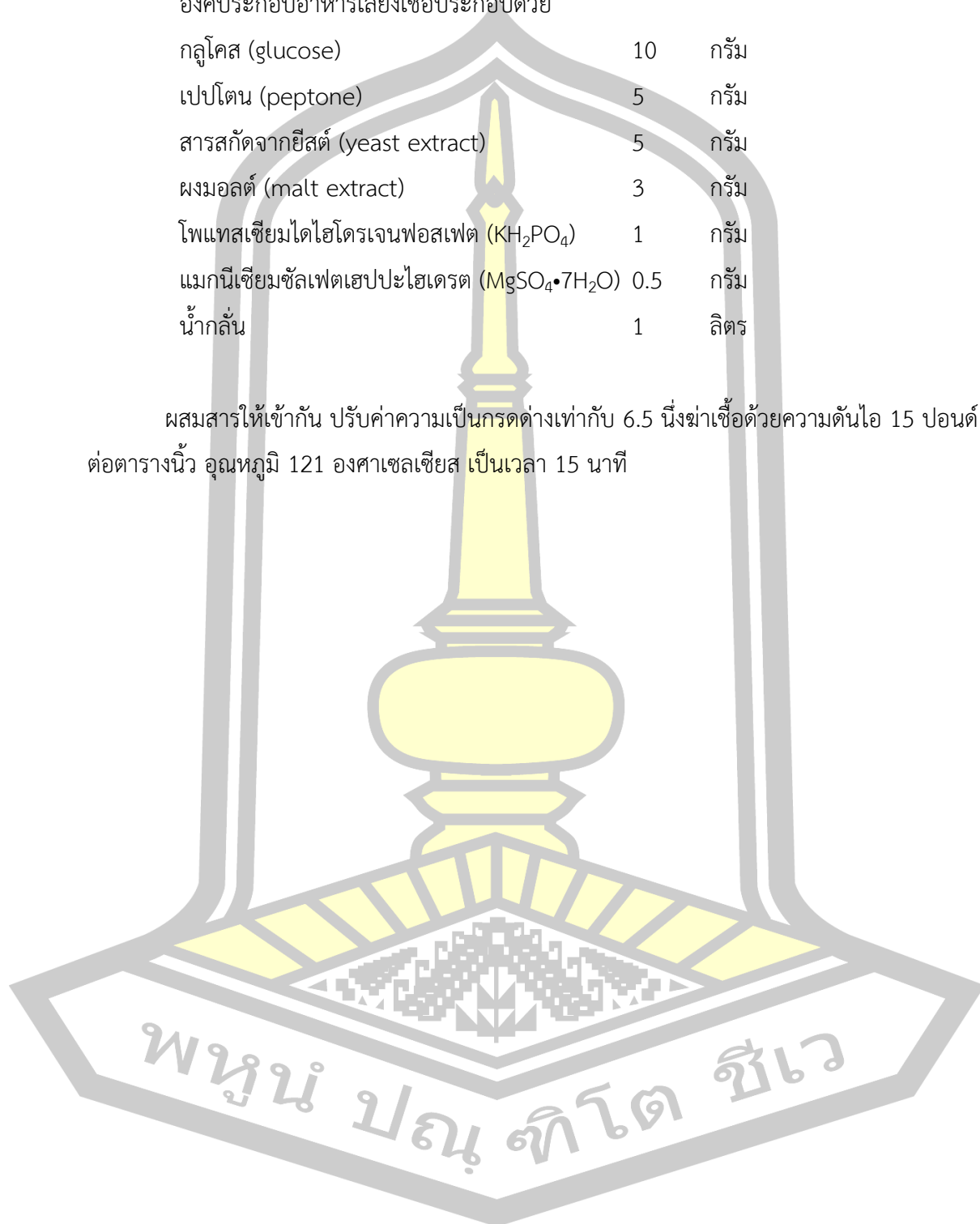


1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGYP (Sankh et al., 2013)

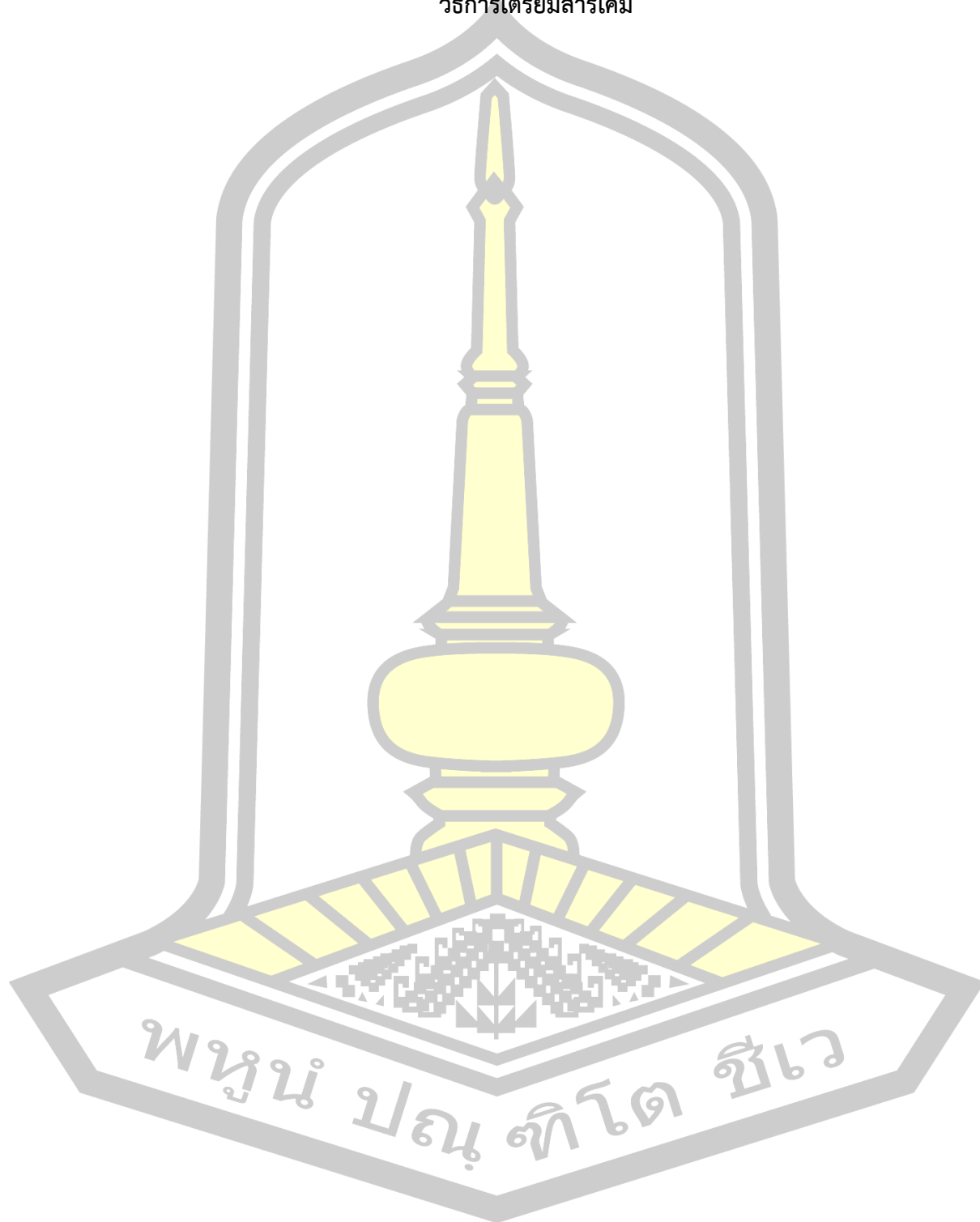
องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย

กลูโคส (glucose)	10	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
ผงมอลต์ (malt extract)	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี



1. การเตรียมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 2%

- 1.1 เติมน้ำกลั่นลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร พอประมาณ
- 1.2 ดูดกรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% ด้วยปิเปตแก้ว
- 1.3 เติมกรดซัลฟูริกปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรที่ใส่น้ำกลั่นเตรียมไว้
- 1.4 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

2. การเตรียมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 2 โมลาร์

- 2.1 เติมน้ำกลั่นลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร พอประมาณ
- 2.2 ดูดกรดไฮโดรคลอริก ด้วยปิเปตแก้ว
- 2.3 เติมไฮโดรคลอริกปริมาตร 18 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรที่ใส่น้ำกลั่นเตรียมไว้
- 2.4 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 0.005 โมลาร์

- 3.1 เติมน้ำปราศจากไอออนลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร พอประมาณ
- 3.2 ดูดกรดไฮโดรคลอริก ด้วยไมโครปิเปต
- 3.3 เติมไฮโดรคลอริกปริมาตร 272 ไมโครลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรที่ใส่น้ำปราศจากไอออนเตรียมไว้
- 3.4 เติมน้ำปราศจากไอออนปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent (ศศิธร ไกรฤทธิชัย, 2552)

- 4.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 4 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 50 มิลลิลิตร
- 4.2 สารละลาย dinitrosalicylic acid เตรียมโดยละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาณ 2.5 กรัม ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อที่ 4.1 จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tatarate) ปริมาณ 75 กรัม นำไปอุ่นและคนจนละลายหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

5. การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) (ศศิธร ไกรฤทธิชัย, 2552)

5.1 เตรียม glucose stock solution ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร โดยชั่งกลูโคส 200 มิลลิกรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

5.2 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่นำมาใช้งาน (working standard solution โดยนำสารละลายในข้อที่ 5.1 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.4 กรัมต่อลิตร

5.3 นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อที่ 5.2 แต่ละความเข้มข้นไปวิเคราะห์โดยการปิเปตสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานดังกล่าว จำนวน 1 มิลลิลิตร

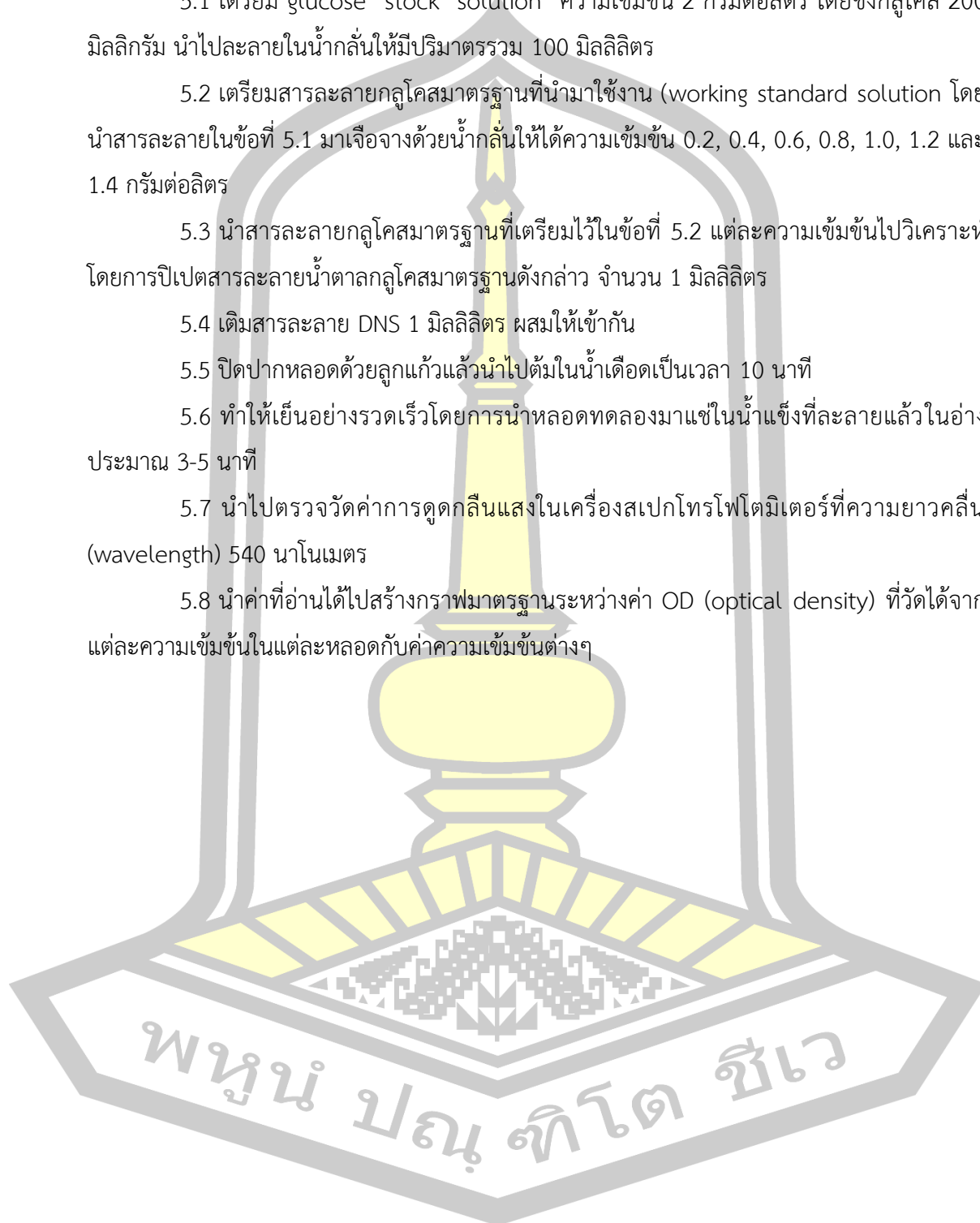
5.4 เติมน้ำตาลละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5.5 ปิดปากหลอดด้วยลูกแก้วแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที

5.6 ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยการนำหลอดทดลองมาแช่ในน้ำแข็งที่ละลายแล้วในอ่างประมาณ 3-5 นาที

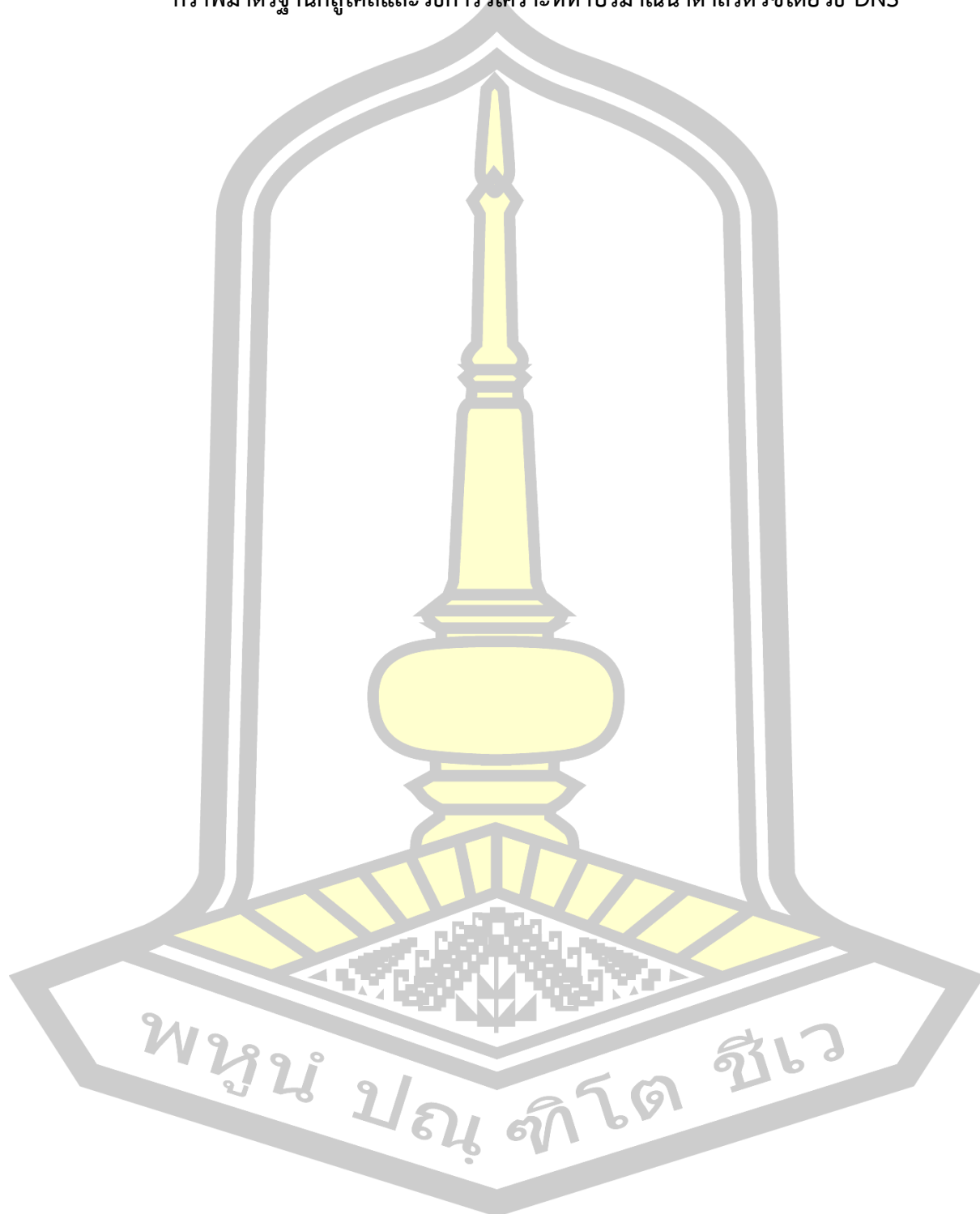
5.7 นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น (wavelength) 540 นาโนเมตร

5.8 นำค่าที่อ่านได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD (optical density) ที่วัดได้จากแต่ละความเข้มข้นในแต่ละหลอดกับค่าความเข้มข้นต่างๆ



ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานกลูโคสและวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS



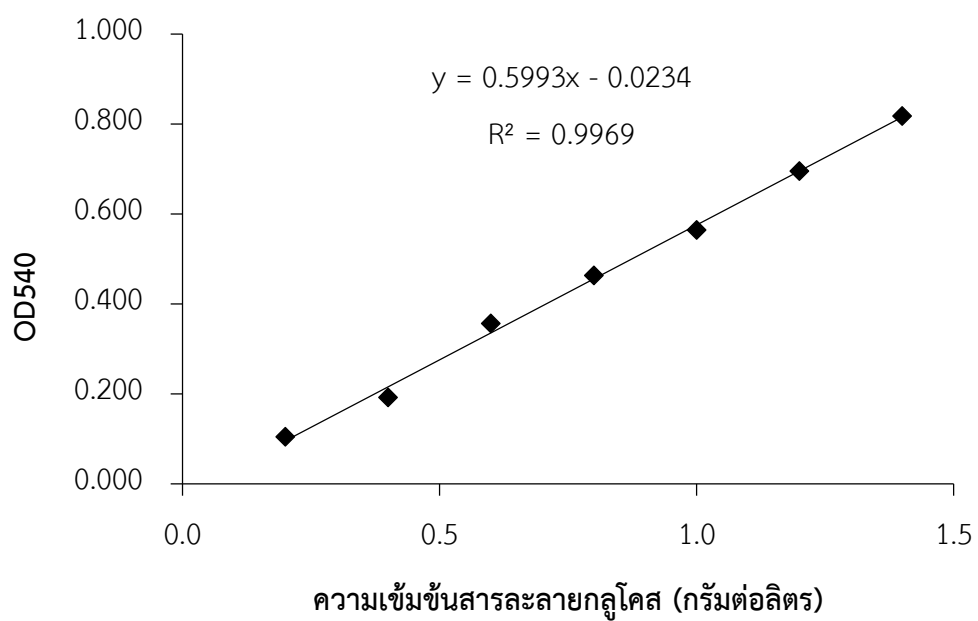
1. กราฟมาตรฐานกลูโคส (glucose standard curve)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี DNS นั้น ในขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานจะเตรียมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.2 ,0.4 ,0.6, 0.8 ,1.0 , 1.2 และ 1.4 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 29 และภาพที่ 26

ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
0.2	0.104
0.4	0.192
0.6	0.356
0.8	0.463
1.0	0.564
1.2	0.695
1.4	0.818





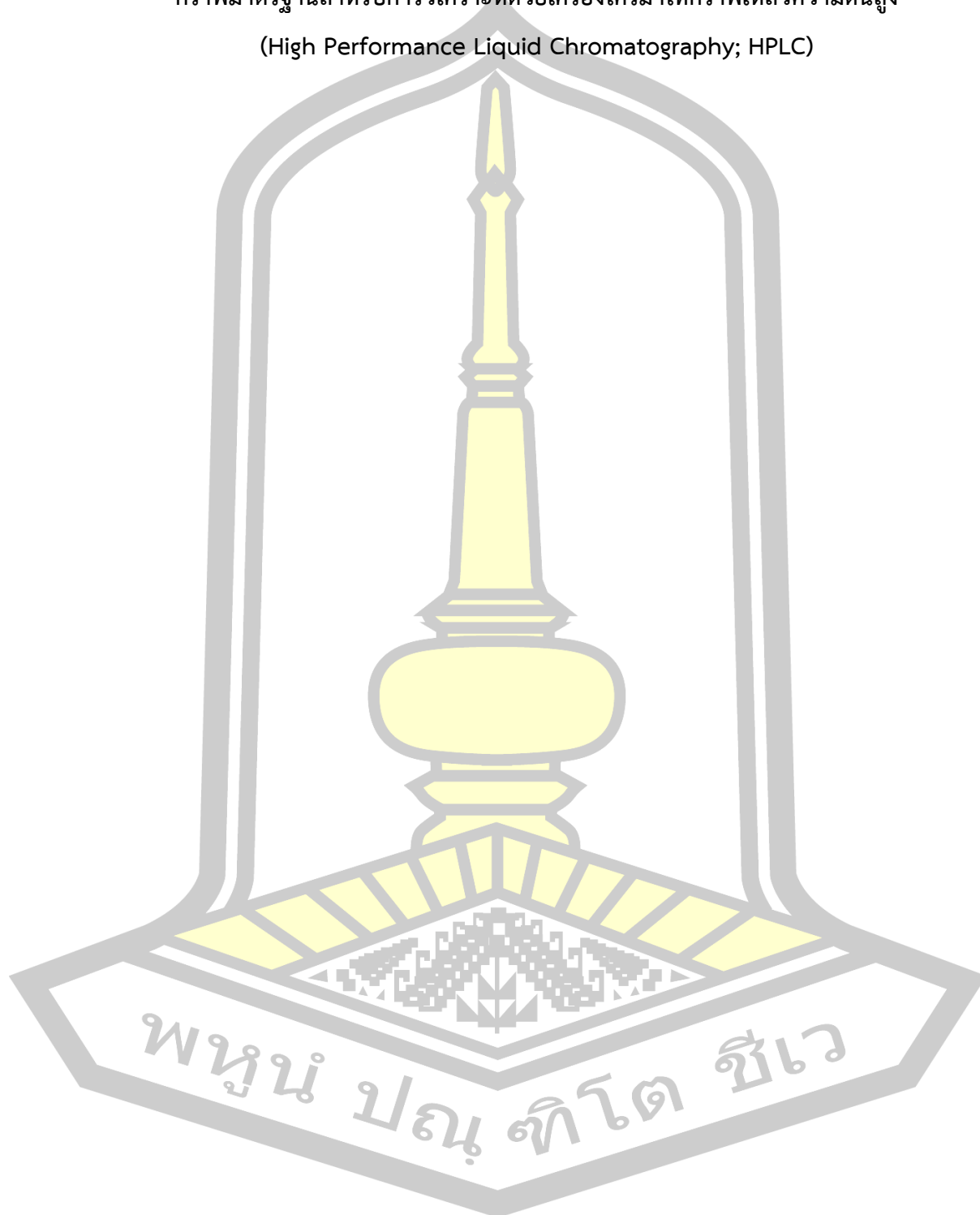
ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานกลูโคส



ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง

(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

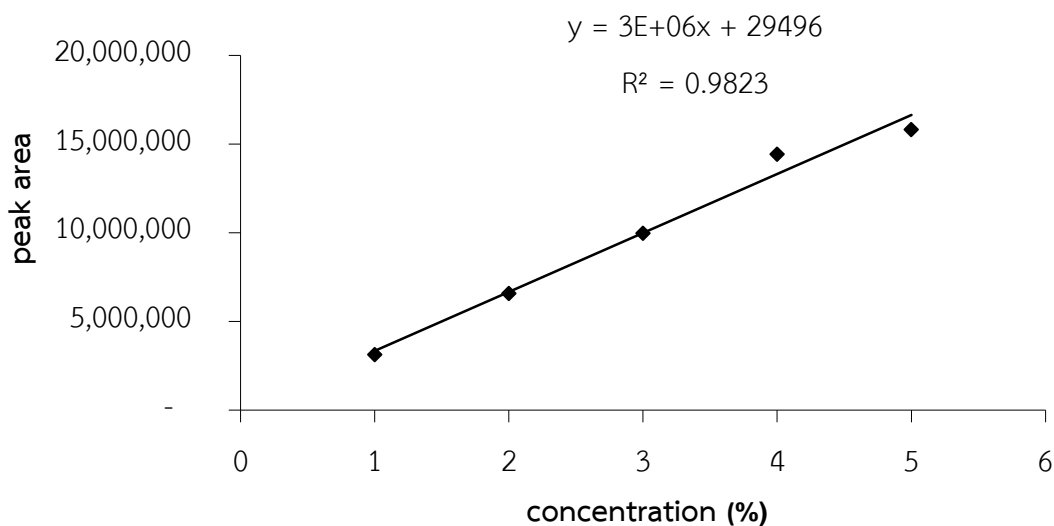


1. กราฟมาตรฐานกลูโคส (glucose standard curve)

เตรียม glucose stock solution ความเข้มข้น 5% โดยชั่งกลูโคสปริมาณ 0.5 กรัม นำไปละลายในน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5% และกรองผ่าน nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ฉีควิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 30 และภาพที่ 27

ตารางที่ 30 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (%)	peak area
1	3,141,695
2	6,585,139
3	9,982,498
4	14,443,157
5	15,821,533



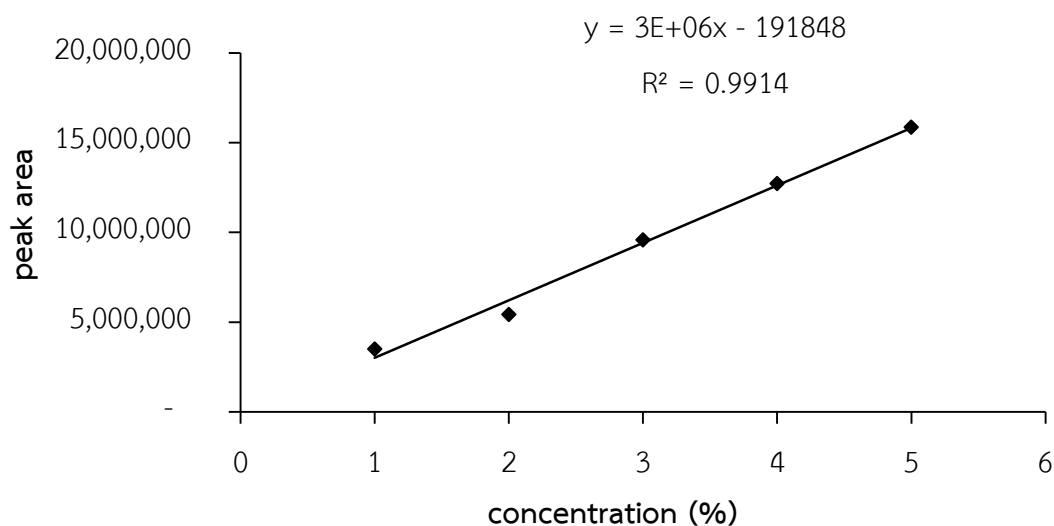
ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐานกลูโคส

2. กราฟมาตรฐานไซโลส (xylose standard curve)

เตรียม xylose stock solution ความเข้มข้น 5% โดยชั่งไซโลสปริมาณ 0.5 กรัม นำไปละลายในน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5% และกรองผ่าน nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 31 และภาพที่ 28

ตารางที่ 31 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไซโลส (%)	peak area
1	3,496,882
2	5,429,286
3	9,589,128
4	12,722,681
5	15,873,884



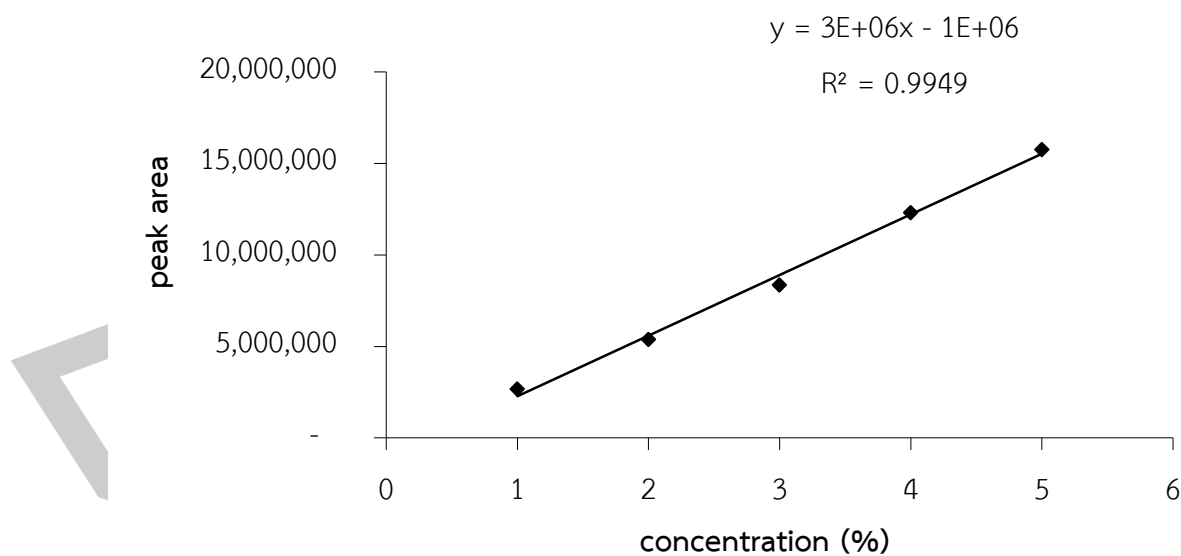
ภาพที่ 28 กราฟมาตรฐานไซโลส

3. กราฟมาตรฐานอะราบินอส (arabinose standard curve)

เตรียม arabinose stock solution ความเข้มข้น 5% โดยชั่งอะราบินอสปริมาณ 0.5 กรัม นำไปละลายในน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5% และกรองผ่าน nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 32 และภาพที่ 29

ตารางที่ 32 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานอะราบินอสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะราบินอส (%)	peak area
1	2,667,683
2	5,386,230
3	8,359,685
4	12,318,699
5	15,769,609



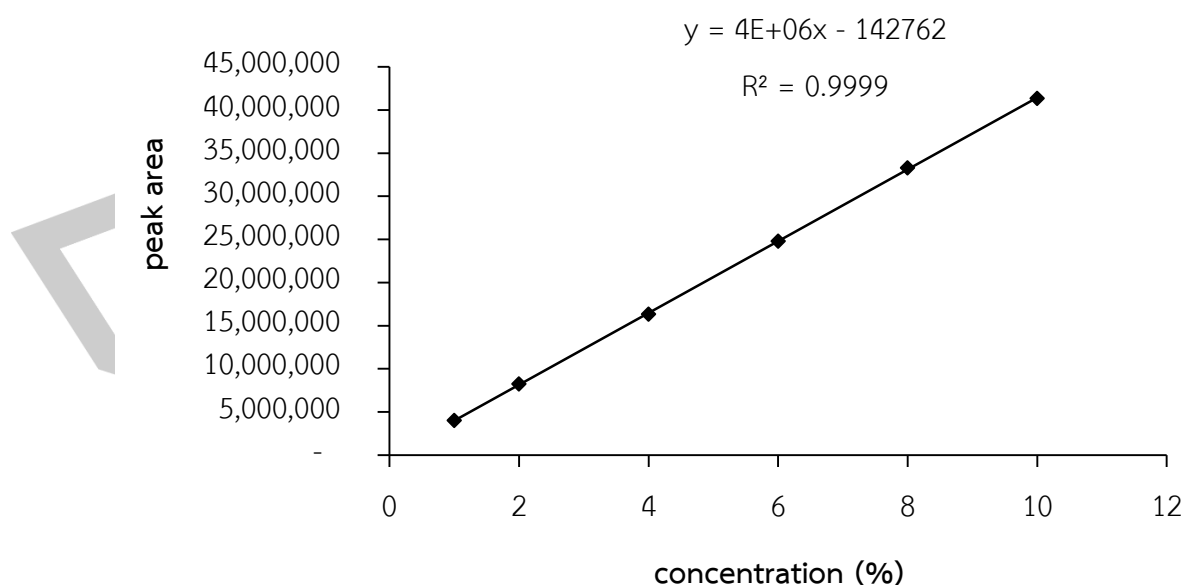
ภาพที่ 29 กราฟมาตรฐานอะราบินอส

4. กราฟมาตรฐานเฟอร์ฟูรัล (furfural standard curve)

เตรียม furfural stock solution ความเข้มข้น 10% โดยดูดสารละลายเฟอร์ฟูรัล (furfural) 99% ปริมาตร 505 ไมโครลิตร นำไปละลายในสารละลายเอทานอล 40% ให้มีปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8 และ 10% และกรองผ่าน nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ฉีควิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 33 และภาพที่ 30

ตารางที่ 33 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเฟอร์ฟูรัลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์ฟูรัล (%)	peak area
1	4,010,897
2	8,249,550
4	16,338,340
6	24,789,553
8	33,301,027
10	41,339,130



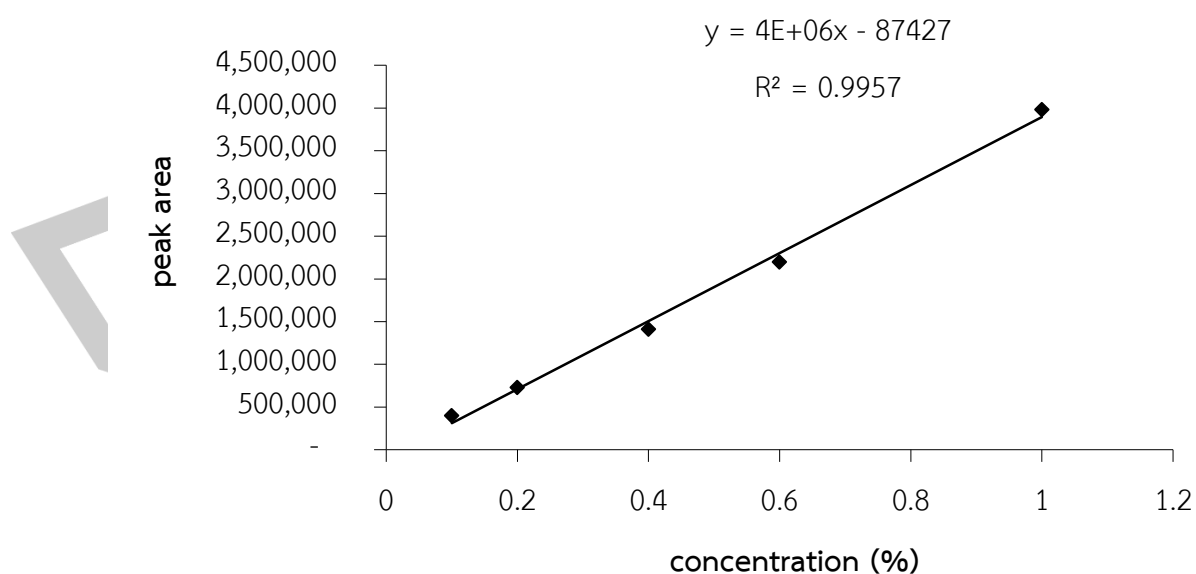
ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานเฟอร์ฟูรัล

5. กราฟมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural standard curve)

เตรียม hydroxymethylfurfural stock solution ความเข้มข้น 1% โดยชั่งไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-hydroxymethylfurfural; HMF) ปริมาณ 100 มิลลิกรัม นำไปละลายในสารละลายเอทานอล 40% ให้มีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 1% และกรองผ่าน nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 34 และภาพที่ 31

ตารางที่ 34 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (%)	peak area
0.1	401,222
0.2	728,245
0.4	1,413,461
0.6	2,197,285
1.0	3,980,873

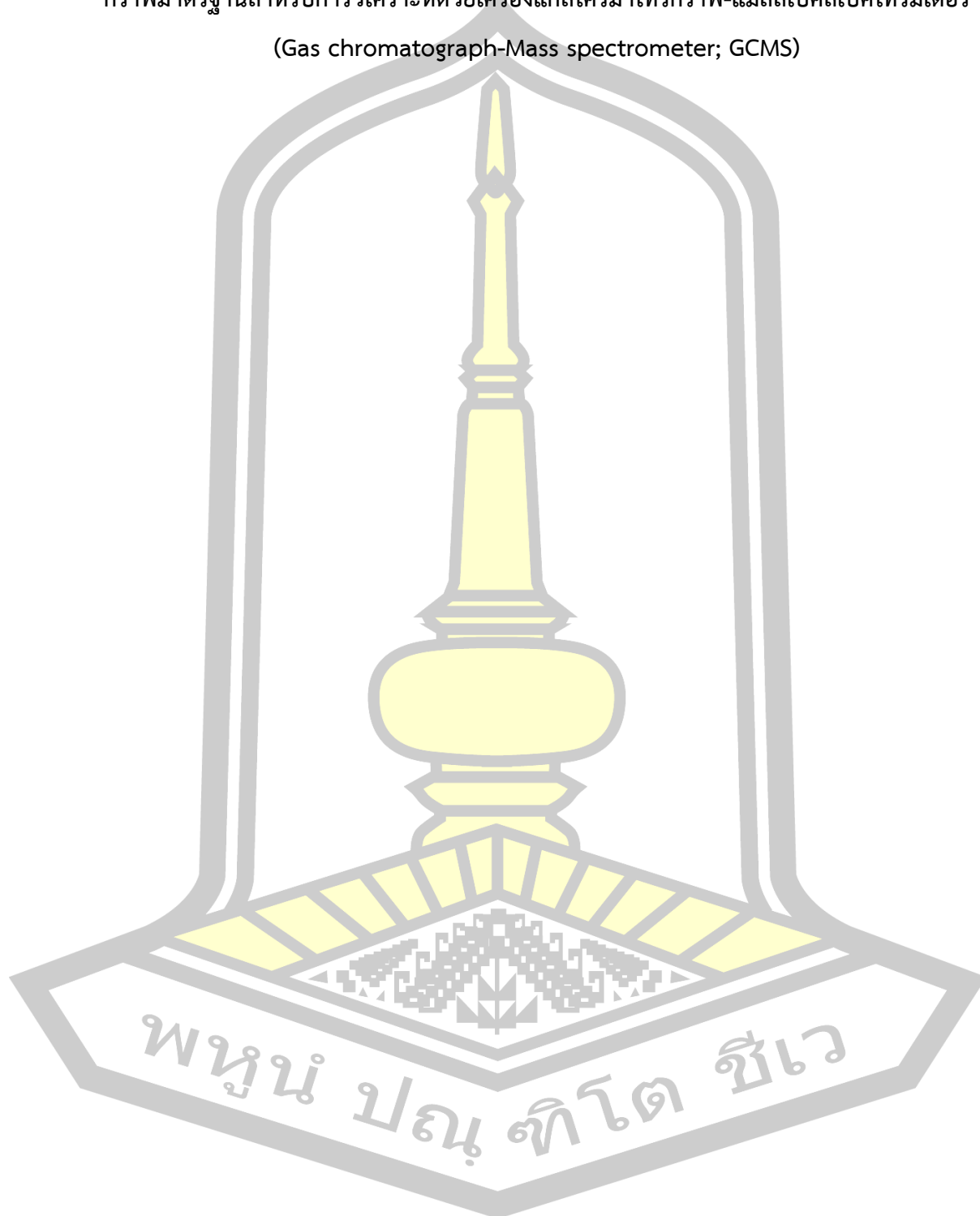


ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล

ภาคผนวก จ

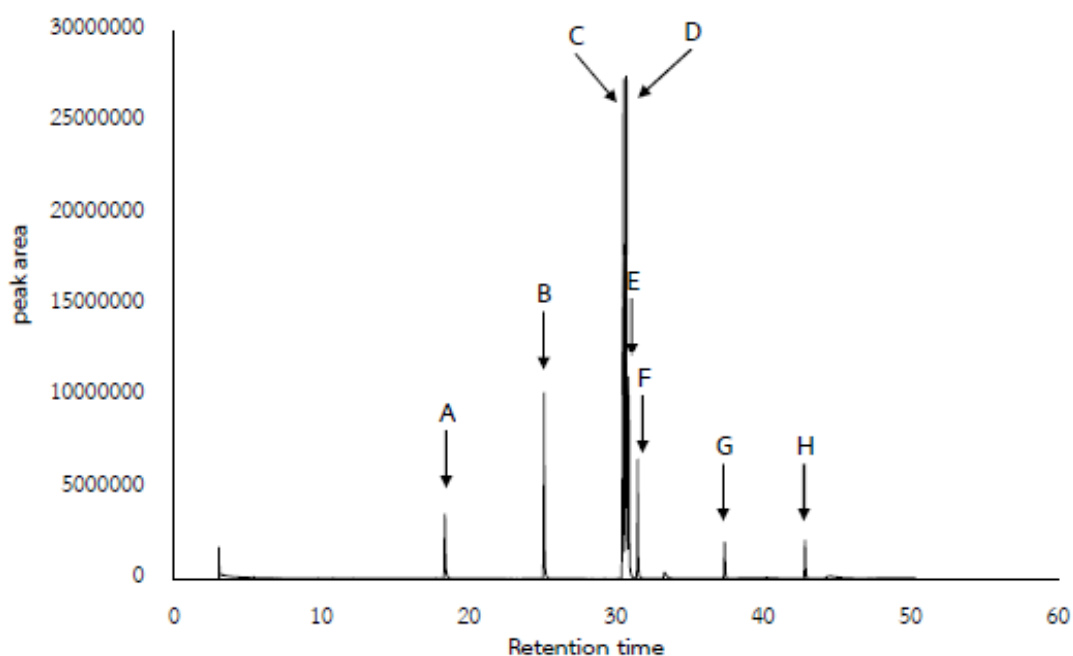
กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

(Gas chromatograph-Mass spectrometer; GCMS)



กราฟมาตรฐานกรดไขมัน (fatty acid standard curve)

เตรียม stock solution ความเข้มข้น 100,000 ppm โดยละลายสารองค์ประกอบมาตรฐาน F.A.M.E. Mix, C14-C22 ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ในเฮกเซนให้มีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเฮกเซนให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 250, 500, 1,000 และ 2,500 ppm และกรองผ่าน nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี โครมาโตแกรม GCMS ของกรดไขมันชนิดต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 32 และตารางที่ 35

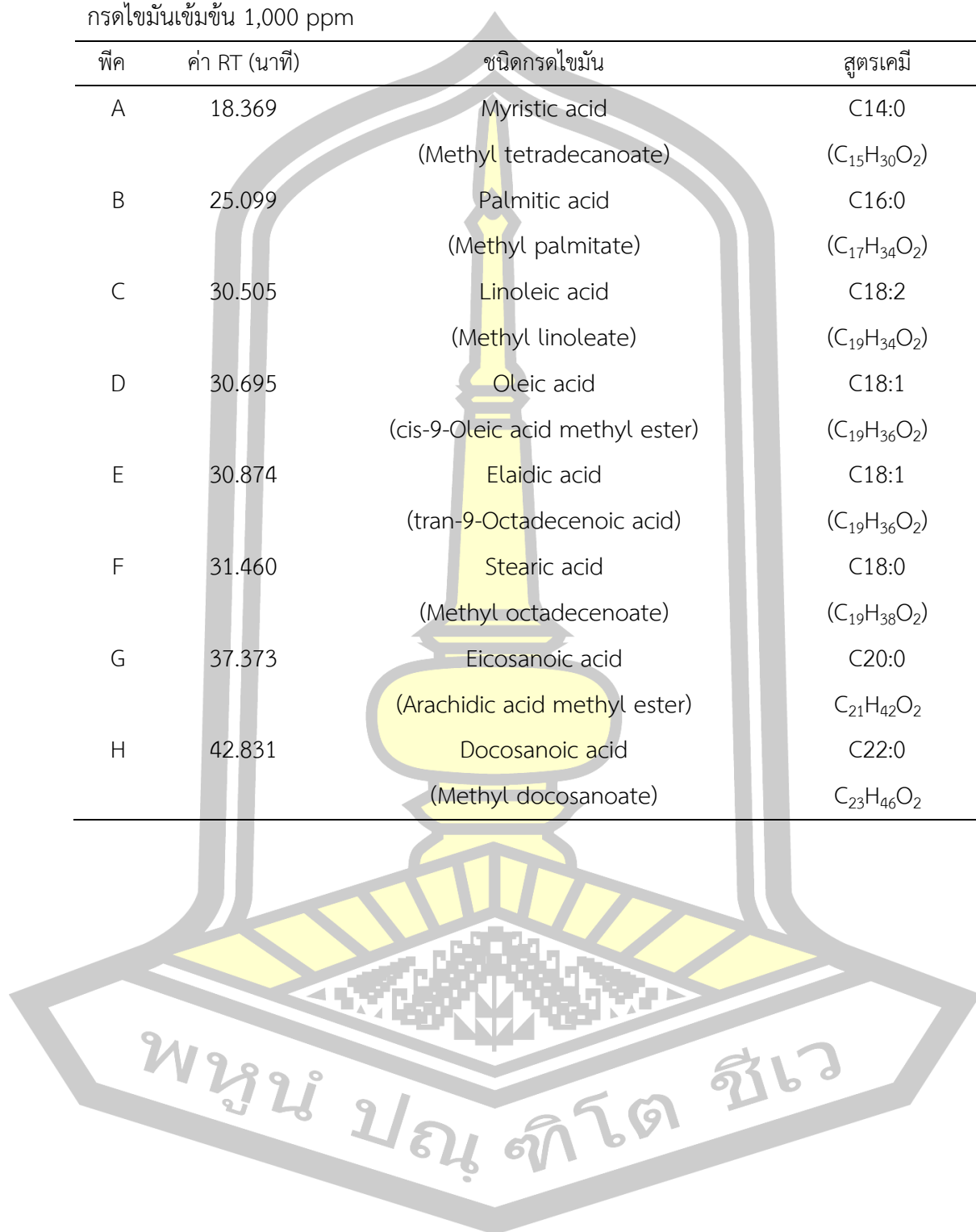


ภาพที่ 32 โครมาโตแกรม GCMS ของกรดไขมันชนิดต่างๆ จากสารองค์ประกอบมาตรฐานกรดไขมัน
เข้มข้น 1,000 ppm

พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 35 กรดไขมันชนิดต่างๆ ที่ปรากฏในโครมาโตแกรม GCMS ของสารองค์ประกอบมาตรฐาน
กรดไขมันเข้มข้น 1,000 ppm

พีค	ค่า RT (นาที)	ชนิดกรดไขมัน	สูตรเคมี
A	18.369	Myristic acid (Methyl tetradecanoate)	C14:0 (C ₁₅ H ₃₀ O ₂)
B	25.099	Palmitic acid (Methyl palmitate)	C16:0 (C ₁₇ H ₃₄ O ₂)
C	30.505	Linoleic acid (Methyl linoleate)	C18:2 (C ₁₉ H ₃₄ O ₂)
D	30.695	Oleic acid (cis-9-Oleic acid methyl ester)	C18:1 (C ₁₉ H ₃₆ O ₂)
E	30.874	Elaidic acid (tran-9-Octadecenoic acid)	C18:1 (C ₁₉ H ₃₆ O ₂)
F	31.460	Stearic acid (Methyl octadecenoate)	C18:0 (C ₁₉ H ₃₈ O ₂)
G	37.373	Eicosanoic acid (Arachidic acid methyl ester)	C20:0 C ₂₁ H ₄₂ O ₂
H	42.831	Docosanoic acid (Methyl docosanoate)	C22:0 C ₂₃ H ₄₆ O ₂

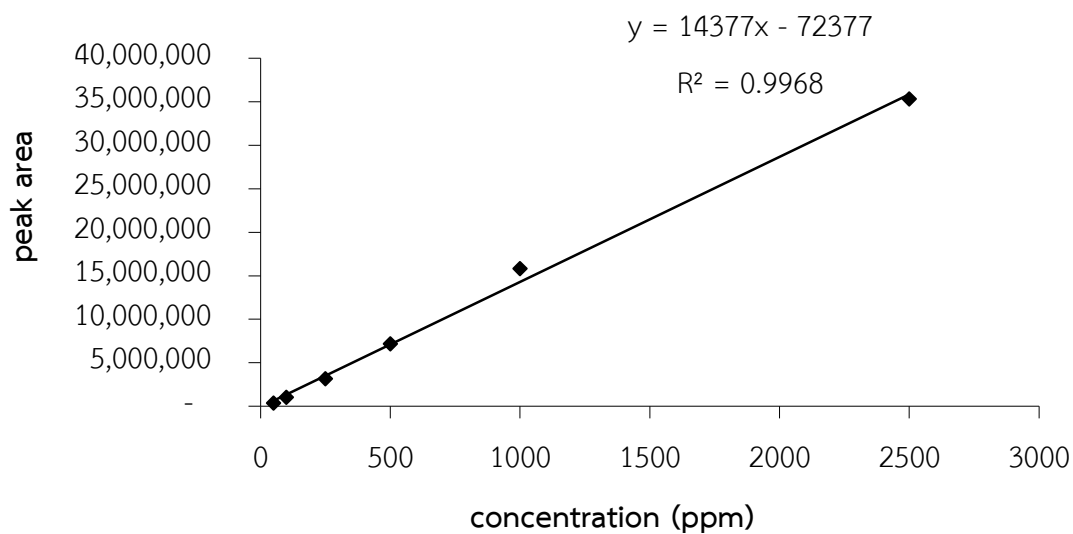


1. กราฟมาตรฐานกรดไมริสติก (myristic acid standard curve)

ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานกรดไมริสติก ดังแสดงในตารางที่ 36 และภาพที่ 33

ตารางที่ 36 พื้นที่ใต้กราฟของกรดไมริสติกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดไมริสติก (ppm)	peak area
50	352,864
100	1,030,682
250	3,152,875
500	7,159,276
1,000	15,815,506
2,500	35,313,213



ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานกรดไมริสติก

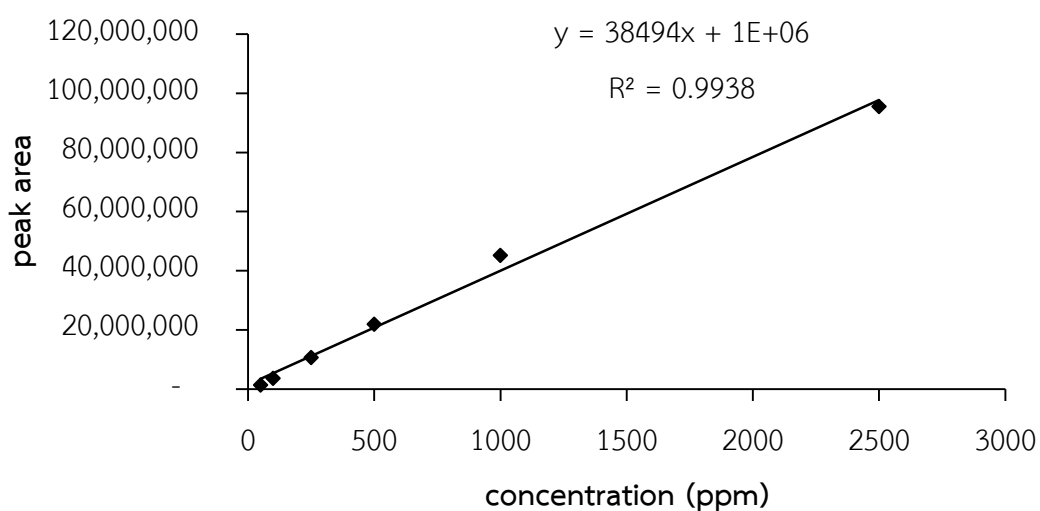
พหุ ประถมศึกษา

2. กราฟมาตรฐานกรดปาล์มมาติก (palmitic acid standard curve)

ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานกรดปาล์มมาติก ดังแสดงในตารางที่ 37 และภาพที่ 34

ตารางที่ 37 พื้นที่ใต้กราฟของกรดปาล์มมาติกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดปาล์มมาติก (ppm)	peak area
50	1,362,148
100	3,605,836
250	10,630,391
500	21,943,269
1,000	45,132,418
2,500	95,559,661



ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานกรดปาล์มมาติก

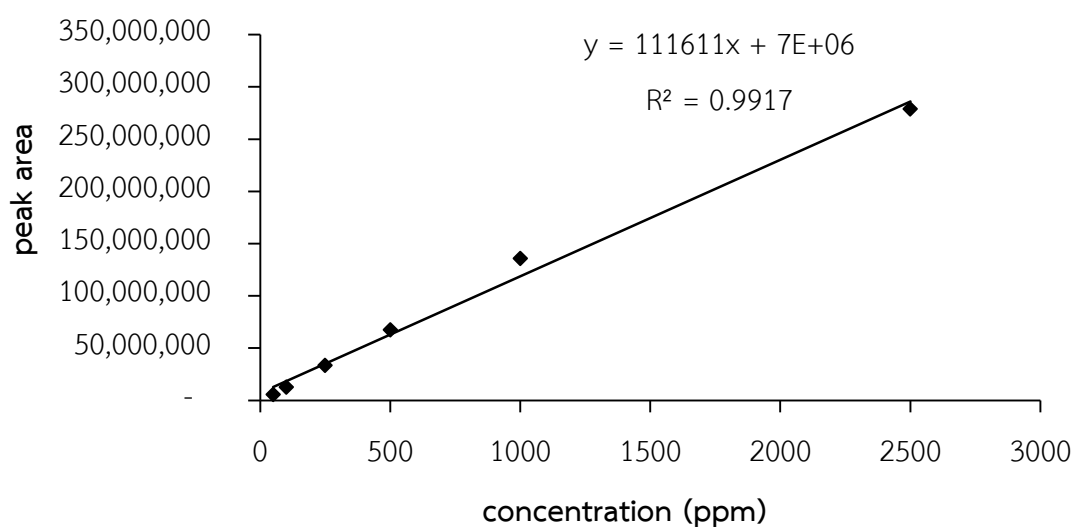
พหุบัณฑิต โสวัต

3. กราฟมาตรฐานกรดลิโนเลอิก (linoleic acid standard curve)

ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานกรดลิโนเลอิก ดังแสดงในตารางที่ 38 และภาพที่ 35

ตารางที่ 38 พื้นที่ใต้กราฟของกรดลิโนเลอิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดลิโนเลอิก (ppm)	peak area
50	5,460,354
100	12,600,633
250	33,572,236
500	67,449,811
1,000	135,886,699
2,500	278,922,981



ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานกรดลิโนเลอิก

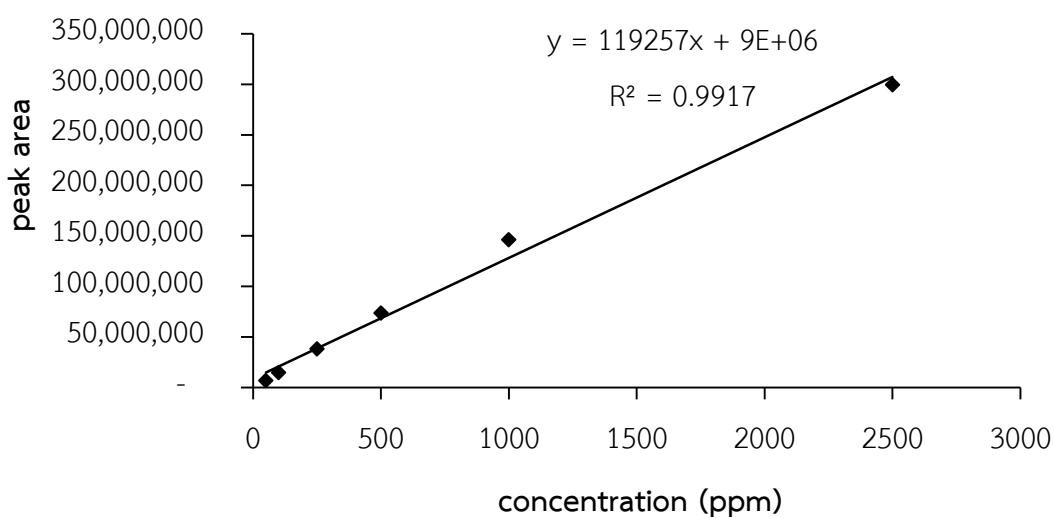
พหุบันฑิต โตะ ชีเว

4. กราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก (oleic acid standard curve)

ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก ดังแสดงในตารางที่ 39 และภาพที่ 36

ตารางที่ 39 พื้นที่ใต้กราฟของกรดโอเลอิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดโอเลอิก (ppm)	peak area
50	6,691,906
100	14,732,800
250	38,063,342
500	73,686,464
1,000	146,224,084
2,500	299,473,738



ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก

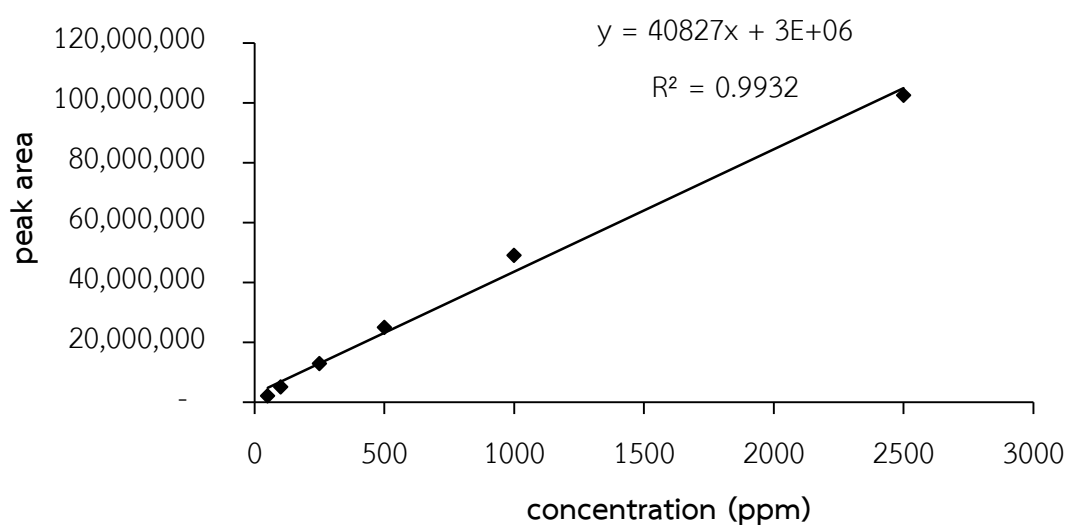
พหุ ประถมศึกษา

5. กราฟมาตรฐานกรดอีไลติก (elaidic acid standard curve)

ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานกรดอีไลติก ดังแสดงในตารางที่ 40 และภาพที่ 37

ตารางที่ 40 พื้นที่ใต้กราฟของกรดอีไลติกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดอีไลติก (ppm)	peak area
50	2,046,415
100	5,036,391
250	12,838,912
500	24,961,384
1,000	49,043,305
2,500	102,491,205



ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานกรดอีไลติก

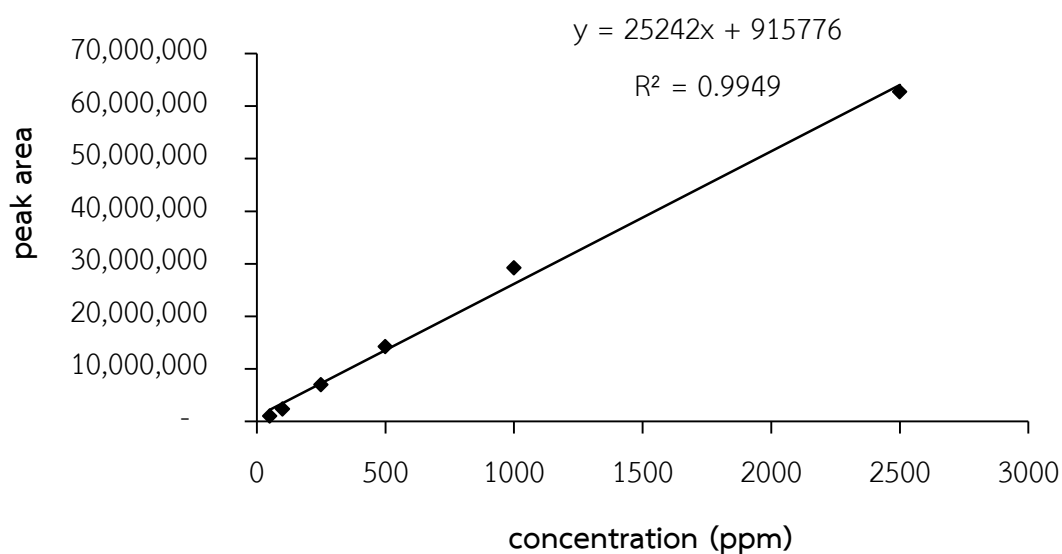
พหุ ประถมศึกษา

6. กราฟมาตรฐานกรดสเตียริก (stearic acid standard curve)

ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานกรดสเตียริก ดังแสดงในตารางที่ 41 และภาพที่ 38

ตารางที่ 41 พื้นที่ใต้กราฟของกรดสเตียริกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดสเตียริก (ppm)	peak area
50	1,013,000
100	2,385,927
250	6,961,801
500	14,210,519
1,000	29,246,033
2,500	62,743,636



ภาพที่ 38 กราฟมาตรฐานกรดสเตียริก

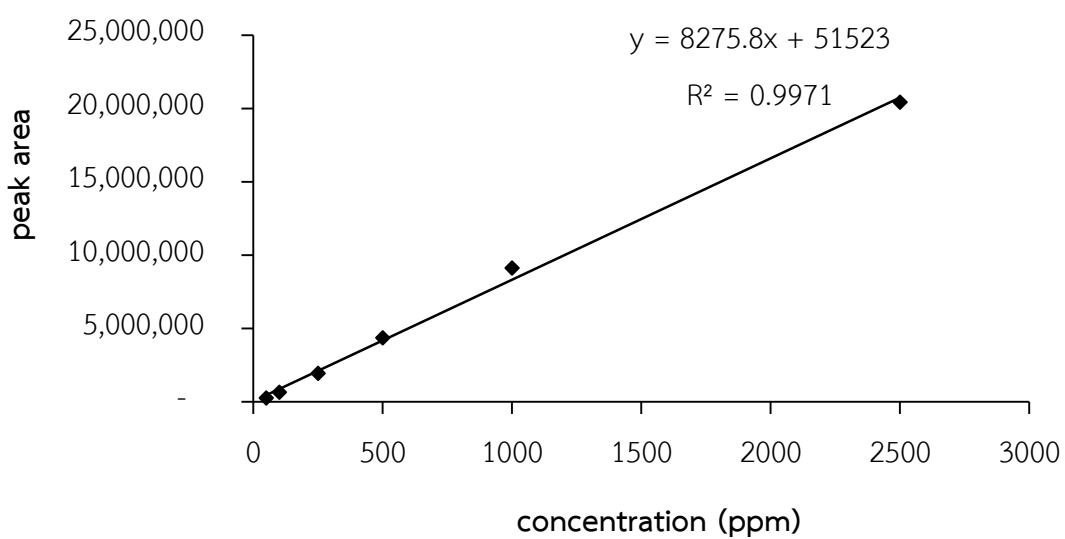
พหุ ประถมศึกษา

7. กราฟมาตรฐานกรดอะราคิติก (arachidic acid standard curve)

ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานกรดอะราคิติก ดังแสดงในตารางที่ 42 และภาพที่ 39

ตารางที่ 42 พื้นที่ใต้กราฟของกรดอะราคิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดอะราคิติก (ppm)	peak area
50	252,977
100	644,655
250	1,934,517
500	4,351,096
1,000	9,112,596
2,500	20,426,761



ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานกรดอะราคิติก

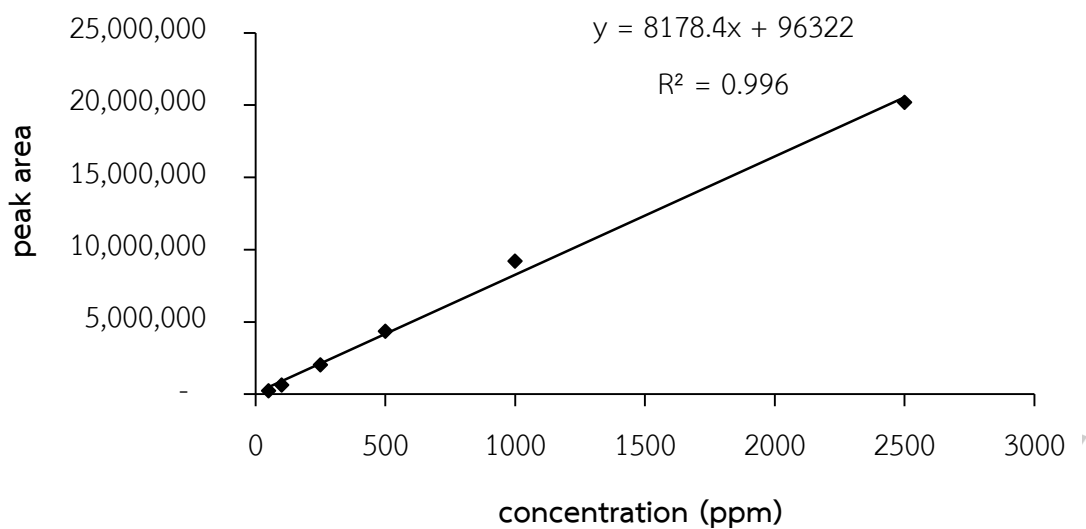
พหุบัน ปณฺ ทิโต ชิว

8. กราฟมาตรฐานกรดโดโคซานอิก (docosanoic acid standard curve)

ผลการทดลองการสร้างกราฟมาตรฐานกรดโดโคซานอิก ดังแสดงในตารางที่ 43 และภาพที่ 40

ตารางที่ 43 พื้นที่ใต้กราฟของกรดโดโคซานอิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดโดโคซานอิก (ppm)	peak area
50	218,462
100	617,156
250	2,020,304
500	4,347,132
1,000	9,183,676
2,500	20,175,948



ภาพที่ 40 กราฟมาตรฐานกรดโดโคซานอิก

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวผกามาศ ราชมนตรี
วันเกิด	วันที่ 10 ธันวาคม พ.ศ. 2524
สถานที่เกิด	อำเภอกระนวน จังหวัดขอนแก่น
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 20 หมู่ 8 ตำบลน้ำอ้อม อำเภอกระนวน จังหวัดขอนแก่น รหัสไปรษณีย์ 40170
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม เลขที่ 80 ถนนนครสวรรค์ ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2547 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2551 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาจุลชีววิทยา ทางอุตสาหกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2561 ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปร.ด.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พูนุ่ ปณุ่ ทิโต ชีเว