BMP14

การผลิตลิปิดโดยยีสต์ไขมันสูงเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

Lipid Production by Oleaginous Yeast and Its Use as Feedstock for Biodiesel Preparation

อภิเชษฐ์ ศรีวิชา (Apichet Sriwicha)* รัตนภรณ์ ลีสิงห์ (Ratanaporn Leesing)**

บทคัดย่อ

ยีสต์ไขมันสูงจัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากมีการสะสมและผลิตลิปิดสูงถึงร้อยละ 20-70 โดยน้ำหนักแห้ง ทดลองแยกยีสต์จากตัวอย่างดินทั้งหมด 53 ตัวอย่างที่เก็บในเขตพื้นที่จังหวัดขอนแก่นและจังหวัดใกล้เคียง ได้ยีสต์ทั้งหมด 76 ไอโซเลท จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีการผลิตและสะสมลิปิดในเซลล์มากที่สุด พบว่า การเพาะเลี้ยงใน Lipid accumulation medium เป็นเวลา 8 วัน มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 30 ^{o}C โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจนและ กลูโคส 80 g/L ในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น พบว่ายีสต์ไอโซเลท U5/2 มีการสะสมลิปิดภายในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 23.26 % โดยน้ำหนักแห้ง ผู้วิจัยคาดหวังว่าผลสำเร็จที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากยีสต์ไขมันสูง

ABSTRACT

The oleaginous yeasts were investigated due to their high potential in biodiesel production. Lipid accumulation and lipid production was approximately 20 – 70 % per kilo dry weight. In the experiment, oleaginous yeast from 53 soil samples were collected in the area of Khon Kaen province and the surrounding provinces, gained 76 isolates. After that, condition for their culture was determined. It was found that cultivation in lipid accumulation medium for 8 days, initial pH 5 and temperature for incubation was 30 ^{o}C. In addition, the required $(NH_4)_2SO_4$ was 0.1 g/L for Nitrogen source. The amount of glucose was 80 g/L. It was found that the strain U5/2 had the optimal accumulation, accounting for 23.26% dry weight. It was anticipated that the results from this study contributes to development of biodiesel development from oleaginous yeast.

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ไขมันสูง การสะสมลิปิด การผลิตลิปิด

Key Words: oleaginous microorganisms, lipid accumulation, lipid production

---

**มหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

***อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

ปริมาณสำรองของน้ำมันดิบลดลงเรื่อยๆ แต่ความต้องการการใช้น้ำมันสูงมากขึ้นตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งปัญหาภาวะโลกร้อนที่เกิดจากการใช้เชื้อเพลิงปิโตรเลียม ทำให้มีการมองหาพลังงานทางเลือกอื่น หนึ่งในนั้นคือ พลังงานชีวภาพ หรือเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยเฉพาะเชื้อเพลิงเหลวไบโอดีเซล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกใหม่ที่ผลิตจากน้ำมันชีวภาพ (bio-oil) น้ำมันชีวภาพที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันมาจากน้ำมันเมล็ดพืช เช่น ปาล์มน้ำมัน น้ำมันพืชใช้แล้ว เป็นต้น จากที่หลายประเทศทั่วโลกตื่นตัวเรื่องการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพ โดยเฉพาะไบโอดีเซลซึ่งต้องใช้พืชน้ำมันในปริมาณสูง นั้นปัญหาที่ตามมาก็คือ เกษตรกรหันไปปลูกพืชน้ำมัน ซึ่งส่งผลให้พื้นที่ในการปลูกพืชอาหารลดลงและมีผลกระทบทางเศรษฐกิจ ดังนั้นนักวิจัยหลายๆ ประเทศจึงมุ่งศึกษาที่จะนำจุลินทรีย์มาผลิตน้ำมันชีวภาพเพื่อใช้ในการเป็นวัตถุดิบในการผลิต ไบโอดีเซลทดแทนการใช้น้ำมันจากพืชน้ำมัน (Ratledge,2002) โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่นักวิจัยสนใจคือ จุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganism) โดยเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตและสะสมลิปิดภายในเซลล์สูง ลิปิดหรือน้ำมันที่ผลิตได้เรียกว่า น้ำมันเซลล์เดียวหรือไขมันเซลล์เดียว (single cell oils) จุลินทรีย์ไขมันสูง เช่น สาหร่ายขนาดเล็ก ยีสต์ รา และแบคทีเรีย (รัตนภรณ์,2550) ยีสต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการผลิตและสะสมลิปิดภายในเซลล์สูง เจริญเร็วและสามารถใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อการเจริญได้ดี และที่สำคัญ ลิปิดที่ผลิตได้เป็น ไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีความคล้ายกับกรดไขมันที่พบในน้ำมันจากเมล็ดพืช (Hanssan,1996) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการผลิตลิปิดจากยีสต์ โดยมุ่งคัดเลือกและเพาะเลี้ยงยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูงจากตัวอย่างดินในพื้นที่ต่างๆ ของจังหวัดขอนแก่นและใกล้เคียง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตลิปิดหรือน้ำมันชีวภาพจากยีสต์ไขมันสูงในระดับห้องปฏิบัติการสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตไบโอดีเซล โดยแยกและคัดเลือกยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตและสะสมลิปิดสูงภายในเซลล์จากตัวอย่างดิน ศึกษาสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไขมันสูงในระดับ ฟลาสก์ พร้อมทั้งปริมาณของกรดไขมันของลิปิดที่พบในยีสต์

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1.ตัวอย่างดินและการคัดแยกยีสต์

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณต่าง ๆ ในเขตจังหวัดขอนแก่น อุดรธานี กาฬสินธุ์ มหาสารคาม อำนาจเจริญ และนครราชสีมา เป็นต้น แล้วนำมาคัดเลือกด้วยเทคนิค spread plate culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Enrichment medium (Glucose 70 g, Yeast extract 5 g , Peptone 5 g, น้ำกลั่น 1 L) บ่มที่ 28–30 ^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกเชื้อบริสุทธิ์เก็บใน Enrichment medium slant ที่ 4^{0}C

2.การคัดเลือกยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตลิปิด

เพาะเลี้ยงยีสต์แต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกเบื้องต้นได้ในข้อ 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lipid accumulation medium (LAM) ที่มี pH เริ่มต้น 5.0 (Glucose 70 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g, Yeast powder (extract) 0.75 g, $Mgso_4.7H_2O$ 1.5 g, KH_2PO_4 0.4 g, $ZnSO_4$ 4.4 mg, $CaCl_2$ 25 mg, $MnCl_2$ 0.05 mg, $CuSo_4$ 0.3 mg, น้ำกลั่น 1 L) ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ 130 – 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28 – 30 ^{0}C เป็นเวลา 3 – 6 วัน เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและตรวจผลการทดลองดังนี้ การเจริญโดยวัดน้ำหนักแห้ง ปริมาณลิปิดตามวิธีการของ Know and Rhee (Kwon,1986) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธี DNS (Miller,1959) จากนั้นคำนวณหาอัตราการผลิตลิปิด (lipid production rate) คัดเลือกยีสต์ไอโซเลทที่มีอัตราการผลิตลิปิดสูงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.การศึกษาสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตและสะสมลิปิด

ศึกษาหาสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตและสะสมลิปิดของยีสต์ไขมันสูงที่คัดเลือกจากข้อ 2 ด้วยการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในระดับฟลาสก์เขย่า

3.1 หาระยะเวลาการเจริญที่เหมาะสมในการผลิตและสะสมลิปิด

เพาะเลี้ยงยีสต์ตามวิธีการข้อ 2 และเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 มาตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับข้างต้น คัดเลือกยีสต์ไอโซเลทที่มีอัตราการผลิตลิปิดสูงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.2 ผลของค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงยีสต์ตามวิธีการข้อ 2 ในสภาวะที่ได้จากข้อ 3.1 และแปรผันค่า pH เริ่มต้น ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น คือ 3, 4, 5, 6, 7 เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับข้างต้น เพื่อหาค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตและสะสมลิปิดในเซลล์ คัดเลือกยีสต์ไอโซเลทที่มีอัตราการผลิตลิปิดสูงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.3 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่ได้จากข้างต้น และแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ คือ 25, 30, 35 ^{o}C มาตรวจวิเคราะห์ เช่นเดียวกับข้างต้น เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตและสะสมลิปิดในเซลล์ คัดเลือกยีสต์ไอโซเลทที่มีอัตราการผลิตลิปิดสูงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

การทดลองโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ ในสภาวะที่คัดเลือกได้จากข้างต้น แปรผันชนิดไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ $(NH_4)_2SO_4$, Urea และ $NaNO_3$ 0.1 g/L มาตรวจวิเคราะห์ เช่นเดียวกันกับข้างต้น เพื่อหาชนิดของ แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตและสะสมลิปิดในเซลล์ จากนั้นแปรผันความเข้มข้นไนโตรเจน จากแหล่งที่ดีที่สุด 0.1-0.5 g/L และวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้างต้น คัดเลือกยีสต์ไอโซเลทที่มีอัตราการผลิตลิปิดสูงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.5 ผลของความเข้มข้นกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

การทดลองโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่คัดเลือกได้จากข้างต้น แปรผันความเข้มข้นของกลูโคส คือ 20-100 g/L มาตรวจวิเคราะห์ เช่นเดียวกันกับข้างต้น เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตและสะสมลิปิดในเซลล์

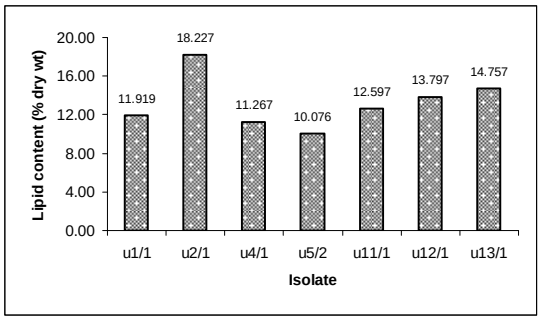
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ตัวอย่างดินและการคัดแยกยีสต์

จากตัวอย่างดินทั้งหมด 53 ตัวอย่างจากขอนแก่น อุดรธานี กาฬสินธุ์ มหาสารคาม อำนาจเจริญ และนครราชสีมา สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้จำนวน 76 ไอโซเลท

การคัดเลือกยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตลิปิด

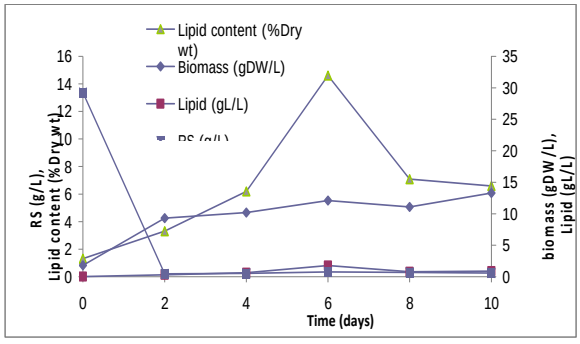
เมื่อนำยีสต์ทั้ง 76 ไอโซเลท มาคัดเลือกหาไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงในการผลิตลิปิดโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Lipid accumulation medium (LAM) pH 5.0 ที่มีกลูโคสสูง บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการข้างต้น พบว่ามียีสต์จำนวน 7 ไอโซเลทจากตัวอย่างดินที่เก็บในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น ได้แก่ ไอโซเลท U1/1, U2/1, U4/1, U5/2, U11/1, U12/1 และ U13/1 ที่มีปริมาณ lipid content อยู่ระหว่าง 10.0–19.0 % โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 1)



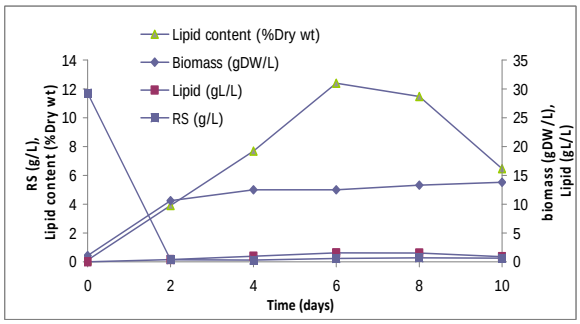
ภาพที่ 1 ปริมาณลิปิด (%โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ไอโซเลท U1/1, U2/1, U4/1, U5/2, U11/1, U12/1 และ U13/1 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LAM ที่มีกลูโคสสูงและ pH 4-5 บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

หาระยะเวลาการเจริญที่เหมาะสมในการผลิตและสะสมลิปิด

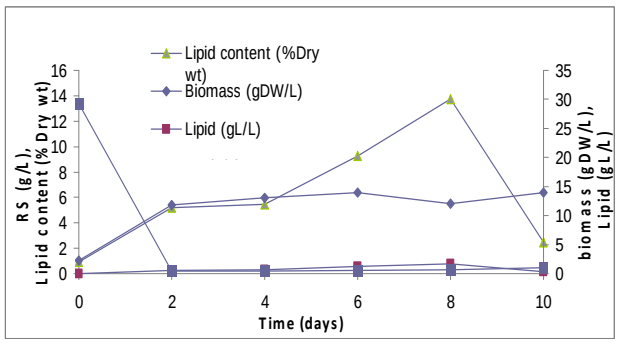
จากการทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์ทั้ง 7 ไอโซเลทที่ได้จากข้างต้น คือ U1/1, U2/1, U4/1, U5/2, U11/1, U12/1, U13/1 และอีก 8 ไอโซเลทที่ได้ผ่านการคัดแยกว่าเป็นไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงในการผลิตลิปิด คือ YU3/1, YU4/1, YU12/1, YU12/2, YU13/2, YU14/1 ที่แยกจากตัวอย่างดินในจังหวัดอุดรธานี และไอโซเลท K36/3, K36/4 ที่แยกจากดินในพื้นที่จังหวัดขอนแก่นมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Lipid accumulation medium pH 5.0 ที่มีกลูโคสสูง (glucose 8 %) เป็นเวลา 10 วัน จากยีสต์ทั้ง 15 ไอโซเลทข้างต้นพบว่ามี 3 ไอโซ เลทคือ ไอโซเลท U5/2, YU12/1 และ K36/4 เป็นไอโซเลทที่มีปริมาณ lipid content สูงสุดอยู่ระหว่าง 12.0–15.0 % โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ในช่วงวันที่ 6-8 ของการบ่มเป็นช่วงที่มีการสะสมลิปิดสูงสุด หลังจากวันที่มีการสะสมลิปิดสูงสุดจะเห็นว่าปริมาณลิปิดที่สะสมในเซลล์ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนลดลงและปริมารสาร metabolite ที่เชื้อผลิตอาจมีส่วนทำให้การเจริญและมีปริมาณลิปิดในเซลล์ลดลงเป็นได้ และเนื่องจากการทดลองต่อไปทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทเพื่อคัดเลือกหาไอโซเลทที่มีการสะสมลิปิสูงสุด จึงใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม คือ 8 วัน (ภาพที่ 2 - 4)



ภาพที่ 2 การเจริญในรูปแบบน้ำหนักแห้ง ชีวมวล (g/L) ปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง), น้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) และลิปิด (gL/L) ของยีสต์ไขมันสูงไอโซเลท U5/2



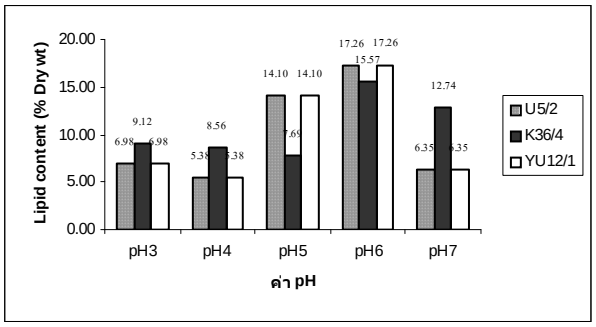
ภาพที่ 3 การเจริญในรูปแบบน้ำหนักแห้ง ชีวมวล (g/L) ปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง), น้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) และลิปิด (gL/L) ของยีสต์ไขมันสูงไอโซเลท YU12/1



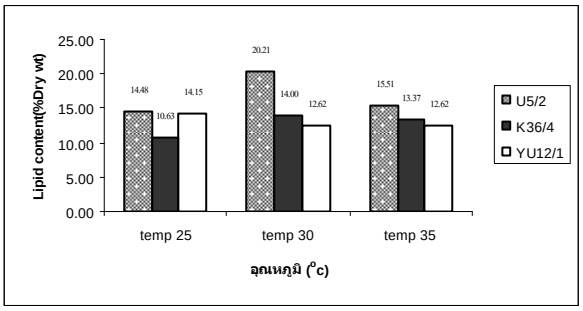
ภาพที่ 4 การเจริญในรูปแบบน้ำหนักแห้ง ชีวมวล (g/L) ปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง), น้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) และลิปิด (gL/L) ของยีสต์ไขมันสูงไอโซเลท K36/4

ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดลองโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ 3 ไอโซเลทคือ ไอโซเลท U5/2, YU12/1 และ K36/4 มาเลี้ยงในสภาวะที่คัดเลือกได้จากข้างต้น แปรผันค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 3-7 ผลปรากฏว่ายีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีการเจริญและมีปริมาณลิปิด (lipid content) สูงสุดอยู่ในช่วงของค่า pH 5-6 ทั้งนี้ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนๆ และในช่วงของค่า pH 5-6 มีการเจริญและมีปริมาณ lipid content ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก Angerbauer (2008) พบว่ายีสต์มีการเจริญและมีการสะสมลิปิดสูงสุดที่ pH 5 ดังนั้นจากการทดลองจึงสามารถศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทต่อไป โดยได้ใช้ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือ 5 (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ลิปิดที่ผลิตได้ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ไอโซเลท U5/2, YU12/1 และ K36/4 เมื่อแปรผันค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH 3, 4, 5, 6 และ7)



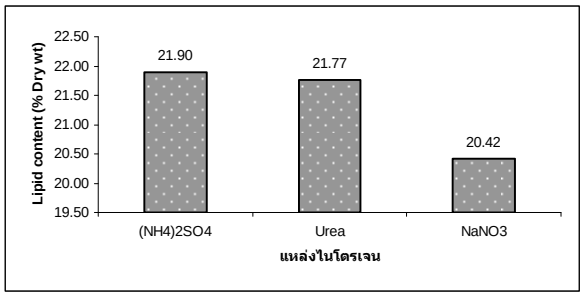
ภาพที่ 6 ลิปิดที่ผลิตได้ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ไอโซเลท U5/2, YU12/1 และ K36/4 ที่อุณหภูมิในการบ่มเชื้อระหว่าง 25, 30, 35 °C

ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

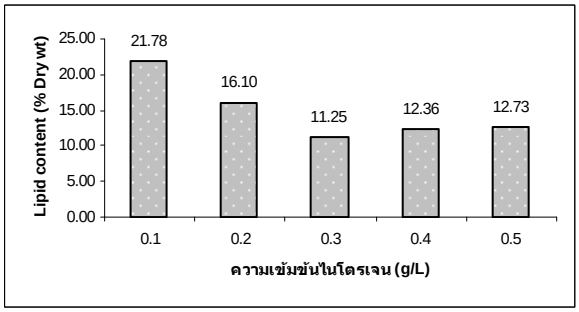
การทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์ 3 ไอโซเลทคือ ไอโซเลท U5/2, YU12/1 และ K36/4 มาทำการเลี้ยงในสภาวะที่คัดเลือกได้แปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อระหว่าง 25, 30, 35 °C ผลปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 30 °C ยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง) สูงที่สุด ดังนั้นจากการทดลองจึงคัดเลือกยีสต์ 1 ไอโซเลทที่มีการสะสมลิปิดสูงสุด คือ ไอโซเลท U5/2 มีปริมาณลิปิดเท่ากับ 20.21% โดยน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °C ยีสต์มีการเจริญและมีปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง)ที่น้อยกว่า ที่อุณหภูมิ 30 °C เพราะที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป ยีสต์มีการเจริญและมีปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง) ลดลง และเมื่ออุณหภูมิลดลงพบว่า จะมีผลทำให้ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีปริมาณเพิ่มขึ้น(รัตนภรณ์,2550) ดังนั้นจากการทดลองจึงสามารถนำยีสต์ไอโซเลท U5/2 มาศึกษาผลของชนิดและปริมาณไนโตรเจน และผลของปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป โดยใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 8 วัน มีค่า pH เริ่มต้น 5 และใช้อุณหภูมิในการบ่ม 30 °C
(ภาพที่ 6)

ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์ ไอโซเลท U5/2 ในสภาวะที่คัดเลือกได้โดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ $(NH_4)_2SO_4$, Urea, $NaNO_3$ ผลปรากฏว่าเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้ยีสต์มีปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง) สูงที่สุด หลังจากที่ทราบแหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$ ทำให้สามารถหาความเข้มข้นไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยแปรผันปริมาณ$(NH_4)_2SO_4$ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 0.1-0.5 g/L ผลปรากฏว่าเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g/L ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง) สูงที่สุด ทั้งนี้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการเจริญของยีสต์ โดยไนโตรเจนจะทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้น แต่ในยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์มากจะมีการผลิตและสะสมลิปิดต่ำ จึงจำกัดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีการผลิตและสะสมลิปิดสูงขึ้น (รัตนภรณ์,2550) ดังนั้นจากการทดลองจึงสามารถนำยีสต์ไอโซเลท U5/2 มาศึกษาความเข้มข้นกลูโคสต่อไป โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ได้ คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 วัน มีค่า pH เริ่มต้น 5 อุณหภูมิในการบ่ม 30 °C โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g/L เป็น แหล่งไนโตรเจน (ภาพที่ 7 , 8)



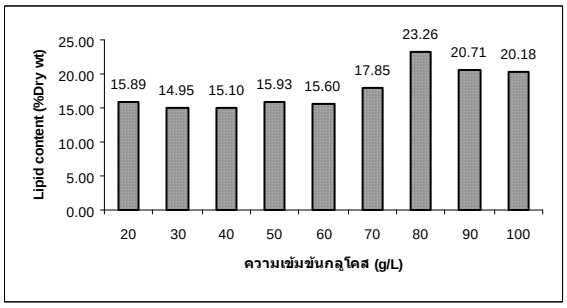
ภาพที่ 7 ลิปิดที่ผลิตได้ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ไอโซเลท U5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ $(NH_4)_2SO_4$, Urea และ $NaNO_3$



ภาพที่ 8 ลิปิดที่ผลิตได้ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ไอโซเลท U5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.1-0.5 g/L

ผลของความเข้มข้นกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

การทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์ ไอโซเลท U5/2 ในสภาวะที่คัดเลือกได้ โดยแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส คือ 20-100 g/L ผลปรากฏว่าที่กลูโคส 80 g/L ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ยีสต์มีปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง) สูงที่สุด เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินพอและจำกัดปริมาณของแหล่งไนโตรเจนทำให้ยีสต์มีการสะสมลิปิดสูงสุด โดยน้ำตาลกลูโคสที่มากเกินพอจะมีการสะสมของ Acetyl CoA และ NADPH สูงในเซลล์ยีสต์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างลิปิด (รัตนภรณ์,2550) ดังนั้นจากการทดลองเราจึงสามารถนำยีสต์ไอโซเลท U5/2 มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ระยะเวลา 8 วัน มีค่า pH เริ่มต้น 5 และใช้อุณหภูมิในการบ่ม 30 ^{o}C ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับ 80 g/L ในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ลิปิดที่ผลิตได้ (% โดยน้ำหนักแห้ง) ของยีสต์ไอโซเลท U5/2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20-100 g/L

สรุปผลการวิจัย

ยีสต์ไอโซเลท U5/2 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น จัดเป็นกลุ่มยีสต์ไขมันสูง เนื่องจากสะสมลิปิดได้สูงกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง และเรียกว่ากลุ่มจุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganisms) คือมีการสะสมลิปิดภายในเซลล์เท่ากับ 23.26 % โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท U5/2 เป็นเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAM ที่มีค่า pH เริ่มต้น 5 มี $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีความเข้มข้นกลูโคสซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 80 g/L จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูง เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด และสามารถคัดแยกยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตและสะสมลิปิดภายในเซลล์สูง คือ ไอโซเลท U5/2 เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ต้องขอขอบคุณอาจารย์ ดร.รัตนภรณ์ ลีสิงห์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยให้คำแนะนำและเทคนิคการทำปฏิบัติการต่างๆเป็นอย่างดี รวมทั้งให้ความรู้ในการทำโครงงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนช่วยชี้แนะแนว

ทางแก้ไขปัญหาต่างๆและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการทำงานวิจัย พร้อมทั้งขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้ให้ความรู้ทางด้านวิชาการให้ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

พิมลพร ศรีราช. (2550). “การคัดเลือกและการเพาะเลี้ยงยีสต์ไขมันสูงเพื่อผลิตน้ำมันชีวภาพ” ขอนแก่น : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

รัตนภรณ์ ลีสิงห์. (2550). “เอกสารประกอบการสอนวิชา 317 438 เชื้อเพลิงชีวภาพ”. ขอนแก่น: ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Angerbauer, C., & Siebenhofer, M., & Mittelbach, M., & Guebitz, G.M. (2008). “Conversion of sewage sludge into lipid by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production”. Bioresource Technology 99, 3051-3056.

Hanssan, M., & Blanc, P.j., & Grangerf, M.L., & Pareilleux, A., & Goma, G. (1996). “Influen of nitrogen and iron limitation on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture”. Process Biochem,31,355-361.

Kwon, D.Y., & Rhee, J.S. (1986), “A Simple and Rapid Colorimetric Method for determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay”. J Am. Oil Chem, Soc 63, 89- 92.

Miller, G.L. (1959). “Ues of dinitrosalisalic acid reagent for determination of reducing sugar”. Anal Chem, 426-428.

Ratledge, C., & James, P.W. (2002). “The biochemistry and molecular biology of ilpid accumulation in oleaginous microorganism”.Adv. Appl. Microbial. 51, 1-51.