Prawarun Agr. J. Volume 15(2) 2018, Pages 345-354

บทความวิจัย

การผลิตไบโอดีเซลจากยีสต์สะสมไขมันสูงโดยใช้ไฮโดรไลเสทซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน

กุสุมาวดี ฐานเจริญ[1*], นิตยา นาฆะเมฆ[2] และอัศนี แสนมา[2]

[1]สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ต. ตลาด อ. เมือง จ. มหาสารคาม 44000
[2]สาขาชีววิทยา คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ต. ตลาด อ. เมือง จ. มหาสารคาม 44000

บทคัดย่อ

การศึกษาความสามารถในการผลิตไขมันจากยีสต์ศักยภาพสูงที่สะสมไขมันในเซลล์จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ BJMK02, CTWY07, CTWY19 และ SCMK77 ในอาหารไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด ภายใต้สภาวะจำกัดแหล่งไนโตรเจน โดยการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟูริกและกรดฟอสฟอริก พบว่า ไฮโดรไลเสทเริ่มต้นมีน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 182.32 และ 2.34 มิลลิกรัมต่อลิตร กำจัดสารพิษในไฮโดรไลเสทด้วยวิธี over liming ร่วมกับการดูดซับด้วยผงคาร์บอน และใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตไขมันโดยยีสต์สะสมไขมันสูงทั้ง 4 สายพันธุ์หมักในระดับฟลาสก์เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์รหัส CTWY07 ให้ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 34.43 ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ องค์ประกอบของกรดไขมันจากยีสต์รหัส CTWY07 ส่วนใหญ่ คือ กรดปาล์มมิติก และกรดโอเลอิก ดังนั้นซังข้าวโพดจึงมีศักยภาพในการใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตไขมันจากจุลินทรีย์สะสมไขมันสูง และสามารถเปลี่ยนเป็นพลังงานทดแทนในรูปไบโอดีเซล

คำสำคัญ : การปรับสภาพ ทรานสเอสเทอริฟิเคชัน น้ำมันจากจุลินทรีย์ ไบโอดีเซล ไฮโดรไลเสท

* ผู้เขียนให้ติดต่อ : E-mail : Kthancharoen@gmail.com

Biodiesel Production by Oleaginous Yeasts using Corncob Hydrolysate as a Carbon Source

Kusumawadee Thancharoen[1*], Nittaya Nakamake[2] and Assanee Sanma[2]

[1]*Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Mahasarakham University, Talat, Mueng, Mahasarakham 44000*

[2]*Department of Biology, Faculty of Education, Rajabhat Mahasarakham University, Talat, Mueng, Mahasarakham 44000*

Abstract

In this study, the lipid production potential of 4 oleaginous yeast strains were BJMK02, CTWY07, CTWY19 and SCMK77 in corncob hydrolysate medium under nitrogen limited condition were investigated. Corncob was treated by dilute sulfuric and phosphoric acid. The hydrolysate contained initial 182.32 mg/L of total sugar and reducing sugar 2.34 mg/L. The hydrolysate, after being detoxified by over liming and absorption with activated charcoal, was use for oil production using 4 oleaginous yeast strains. After 144 hour growth in shake - flasks, the CTWY07 had highest lipid content 34.43% of dry cell weight compared with other oleaginous strains. The fatty acid composition of CTWY07 obtained palmitic acids and oleic acids were the major fatty acid. Corncob thus is a promising raw material for microbial oil production by oleaginous microorganism and application for biodiesel renewable.

Keywords : Pre-treatment, Transesterification, Single cell oil, Biodiesel, Hydrolysate

* Corresponding author : E-mail : Kthancharoen@gmail.com

บทนำ

โลกในปัจจุบันกำลังประสบกับปัญหาปริมาณน้ำมันที่ลดลงจนใกล้จะหมดลงทุกขณะ ราคาน้ำมันจึงมีราคาสูงขึ้น สาเหตุประการหนึ่งที่สำคัญเนื่องจากปริมาณการผลิตเครื่องยนต์ดีเซลเพิ่มสูงขึ้น ไบโอดีเซลมีลักษณะเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันเรียกว่า Fatty acids (FAs) methyl esters ได้จากไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols) ที่ผ่านกระบวนการทรานสเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (Transesterification) โดยใช้น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ใช้แล้วมาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอลล์ สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนเครื่องยนต์ดีเซลและให้ความร้อนแก่ระบบไบโอดีเซลเป็นแหล่งพลังงานที่มีศักยภาพเพียงพอสามารถใช้เป็นแหล่งน้ำมันทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมที่มีอย่างจำกัด และเป็นพลังงานฟอสซิลที่ใช้แล้วหมดไปได้ (Azocar *et al*., 2010; Liu and Zhao, 2007; Zhu *et al*., 2008) ดังนั้นไบโอดีเซลจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การปลดปล่อยปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซัลเฟอร์ และสารพิษที่เป็นอันตรายออกสู่ชั้นบรรยากาศในปริมาณน้อยมาก (Meng *et al*., 2009) การใช้ไบโอดีเซลสามารถลดปริมาณก๊าซพิษที่ถูกปลดปล่อยได้ถึงร้อยละ 78 ของวัฏจักร เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันปิโตรเลียม (Helwani *et al*., 2009) อีกทั้งผลิตได้จากทรัพยากรธรรมชาติหมุนเวียน แต่การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้พืชน้ำมันยังมีต้นทุนการผลิตที่สูงถึงร้อยละ 70-85 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด การสกัดไขมันจากเมล็ดพืชไปใช้ ทำให้น้ำมันไม่เพียงพอต่อความต้องการทั้งภายในประเทศและต่างประเทศด้วย รวมถึงต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ในการผลิตพืชน้ำมัน เช่น ฤดูกาล ระยะเวลาในการปลูก และการเก็บเกี่ยว เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาหาแนวทางและแหล่งทางเลือกใหม่ในการเพิ่มปริมาณไขมันให้สูงขึ้นในระยะเวลาที่สั้นลง เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการและลดต้นทุนในการผลิต ในปัจจุบันมีการลงทุนและพัฒนาจุลินทรีย์สะสมไขมัน พบว่า มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสะสมไขมันได้ เช่น ยีสต์ เชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตไขมันหรือน้ำมันได้มากกว่าร้อยละ 60 ของน้ำหนักแห้งในสภาวะจำกัดไนโตรเจน โดยไขมัน หรือน้ำมันที่ผลิตได้จะมีลักษณะเหมือนกับไขมัน หรือน้ำมันที่พบในพืชน้ำมัน และอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์มากถึงร้อยละ 80-90 ของปริมาณไขมันหรือน้ำมันที่พบ การใช้จุลินทรีย์ผลิตไขมันหรือน้ำมันมีข้อได้เปรียบมากกว่าการผลิตจากพืชน้ำมันหลายประการ เช่น ใช้เวลาในการผลิตสั้น เพราะจุลินทรีย์มีช่วงชีวิตสั้นกว่า และยังใช้แรงงานในการเก็บเกี่ยวน้อยกว่า นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมน้อยกว่า และสามารถเพิ่มกำลังการผลิตได้ง่ายกว่าพืชน้ำมันอีกด้วย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้จุลินทรีย์จัดเป็นแหล่งของไขมัน หรือน้ำมันเพื่อการผลิตไบโอดีเซลที่สำคัญในอนาคต (Sirisansaneeyakul, 2011) โดยเฉพาะยีสต์นั้นจัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากสามารถผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์ได้สูงถึงร้อยละ 60-70 และไขมันที่ผลิตได้จัดเป็นไตรกลีเซอไรด์ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันส่วนใหญ่ คือ กรดปาล์มมิติก กรดโอเลอิค และกรดสเตียริก ซึ่งมีความคล้ายกับน้ำมันจากเมล็ดพืช ข้อได้เปรียบของยีสต์ในด้านการเพาะเลี้ยง คือ เจริญเร็ว ใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกได้ เช่น ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรม หรือน้ำตาลจากวัสดุการเกษตร (Leesing, 2013)

แหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตไบโอดีเซลและมีความน่าสนใจในปัจจุบันคือ วัสดุที่เหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูกและมีอย่างแพร่หลายในประเทศที่เป็นเกษตรกรรม เช่น ประเทศไทย โดยเฉพาะฟางข้าว ชานอ้อย หรือซังข้าวโพดที่มีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเศษเหลือทิ้งของวัสดุเหล่านี้โดยเฉพาะซังข้าวโพดหากมีการเผาเปลือก และซังข้าวโพดในที่โล่งแจ้งจะก่อให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ ฝุ่น ออกไซด์ของไนโตรเจน และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ รวมเท่ากับ 1,917.69, 68.68, 23.38, 3.57 และ 0.46 กรัมต่อกิโลกรัมชีวมวลแห้ง ตามลำดับ การเผาต้น/ตอ/ใบข้าวโพดในที่โล่งแจ้งก่อให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ ฝุ่น ออกไซด์ของไนโตรเจน และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ รวมเท่ากับ 1,147.43, 63.74, 3.39, 2.31 และ 0.54 กรัมต่อกิโลกรัมชีวมวลแห้ง ตามลำดับ (National Research Council of Thailand, 2011) โดยการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการเป็นสับสเตรทเพื่อผลิตพลังงานทดแทนอย่างไบโอดีเซลอย่างมีประสิทธิภาพและคุ้มค่าต่อการลงทุน จึงเป็นเรื่องที่มีความน่าสนใจเนื่องจากสามารถลดปัญหาสิ่งแวดล้อม เพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้ง และลดต้นทุนในการผลิต จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า การใช้วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเหลือทิ้งสามารถลดต้นทุนในการผลิตได้ถึงร้อยละ 75 (Guo *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2009) ในงานวิจัยนี้จึงได้เห็นความสำคัญของยีสต์สะสมไขมันสูง เพื่อนำไปผลิตไบโอดีเซล ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันจากฟอสซิลที่กำลังจะหมดไป อีกทั้งยังมองหาแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกไม่กระทบต่อภาคอุตสาหกรรมอาหาร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์สะสมไขมันสูง

ยีสต์สะสมไขมันสูงทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ รหัส BJMK02 (คัดแยกจากฟักข้าว), CTWY07 (คัดแยกจากน้ำทิ้งโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม), CTWY19 (คัดแยกจากน้ำทิ้งโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม) และ SCMK77 (คัดแยกจากชานอ้อยโรงงานน้ำตาล) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast Extract Peptone - Dextrose Agar (YPD) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 144 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อบันทึกผลการเจริญ

2. การผลิตไขมันและไบโอดีเซลในไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด

2.1 การเตรียมซังข้าวโพด

อบซังข้าวโพดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2-10 มิลลิเมตร

2.2 การปรับสภาพซังข้าวโพด

ซังข้าวโพดที่ผ่านการอบ เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตร ผสมกับกรดฟอสฟอริกเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยใช้อัตราส่วนของซังข้าวโพดโดยน้ำหนักต่อสารละลายกรดเท่ากับ 1:3 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมผงถ่าน (activated carbon) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารละลายที่ได้ปรับค่าพีเอชด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (CaOH) โดยให้ค่าพีเอชเท่ากับ 10 กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 แล้วปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 โมลาร์จนได้พีเอชเท่ากับ 6 ทำการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959) และวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric method (Dobois *et al*., 1956)

2.3 การผลิตไขมันจากยีสต์สะสมไขมันสูง

เพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ในอาหาร YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมอาหารที่มีไฮโดรไลเสทซังข้าวโพดและเติมเชื้อตั้งต้นของยีสต์สะสมไขมันสูงร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 144 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การสกัดไขมัน

ตัวอย่างหลังการปั่นเหวี่ยงในข้อ 2.3 ทำการเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนและเมทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะเกิดการแยกชั้นของไขมันและสารละลายที่ใช้ในการสกัด ทำการสกัดเฉพาะชั้นไขมัน (อยู่ด้านบนของสารละลาย) ชั่งน้ำหนักไขมัน จากนั้นนำค่าน้ำหนักไขมันกับค่าน้ำหนักแห้งไปหาความสัมพันธ์ดังนี้ (Liu *et al*., 2015)

Lipid titer (g/L) = ไขมันที่สกัดได้ต่อตัวอย่างปริมาตร 1 ลิตร

$$\text{Lipid content (\% w/w)} = \frac{\textbf{Lipid titer (g/L) X 100}}{\textbf{น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)}}$$

$$\text{Lipid yield (\% g/g)} = \frac{\textbf{Lipid titer (g/L) X 100}}{\textbf{น้ำตาลที่เหลือ (g/L)}}$$

2.5 การผลิตไบโอดีเซล

น้ำมันที่ผลิตได้จากยีสต์สะสมไขมันสูงที่ทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เติมเมทานอลโดยอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก นำส่วนผสมไปบ่มให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเทส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในกรวยแยกตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นระหว่างกลีเซอรอลกับไบโอดีเซล โดยชั้นบนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซล และส่วนชั้นล่างเป็นกลีเซอรอล แยกกลีเซอรอลออก

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของเมทิลเอสเทอร์

วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซลที่ได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี ทำกราฟมาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์มาตรฐาน โดยการชั่งน้ำหนักที่แน่นอนนำมาเปรียบเทียบกับเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ในข้อ 2.5 โดยนำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่อง Gas

Chromatography masss-pectrometer(GCMS-QP2010 Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ชนิด Select Biodiesel for Flame, length 30 m., 320 µm ID, 0.25 µm film thickness สภาวะที่ใช้ คือ ที่อัตราไหลของแก๊สพาเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะตู้อบมีอุณหภูมิเริ่มต้น 210 องศาเซลเซียส คงที่ 12 นาที และเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส คงที่ 8 นาที ตรวจวัดสัญญาณของสารด้วยตัวตรวจวัดชนิด Electron Ionization ผลการทดลองคำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟของ peak ซึ่งนำมาหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในตัวอย่างได้ โดยการเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของ peak เมทิลเอสเทอร์มาตรฐานที่ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนในแต่ละความเข้มข้น (Samniang *et al*., 2014)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการวิจัย

1. สัณฐานวิทยาของยีสต์สะสมไขมัน

ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YPD และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์คือ รหัส BJMK02, CTWY07, CTWY19 และ SCMK77 ผลการศึกษาแสดงใน Fig. 1 และ Table 1

Table 1 Morphological characteristics and cell shape of oleaginous yeast under microscope

Yeast strains	Morphology			Cell shape
	Color	Margin	Elevation	
BJMK02	Cream	Entire	Flat	Ellipsoidal
CTWY07	White	Entire	Convex	Oval
CTWY19	White	Entire	Raised	Oval
SCMK77	Orange	Entire	Convex	Spherical

จาก Fig. 1 และ Table 1 สัณฐานวิทยาของยีสต์ที่ศึกษามีสีโคลนีสีครีม ขาว และส้มแดง ในขณะที่รูปร่างเซลล์มีลักษณะเป็นรูปรี ไข่ และกลม โดยสายพันธุ์ CTWY07 และ CTWY19 มีความคล้ายคลึงกัน คือ มีโคโลนีสีขาวและเซลล์เป็นรูปไข่เหมือนกัน แต่มีความนูนของโคโลนีแตกต่างกัน สำหรับสายพันธุ์ BJMK02 มีโคโลนีสีครีม และเซลล์มีรูปร่างรี และสายพันธุ์ SCMK77 มีโคโลนีสีส้มแดง และเซลล์มีรูปร่างกลม โดยยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ผ่านการคัดเลือกของการสะสมไขมันในเซลล์โดยคัดเลือกเบื้องต้นจากการติดสีย้อมแบบซูดาน แบล็ค บี และการผลิตไขมันได้สูงในอาหารจำกัดแหล่งไนโตรเจน (Thancharoen *et al*., 2017)

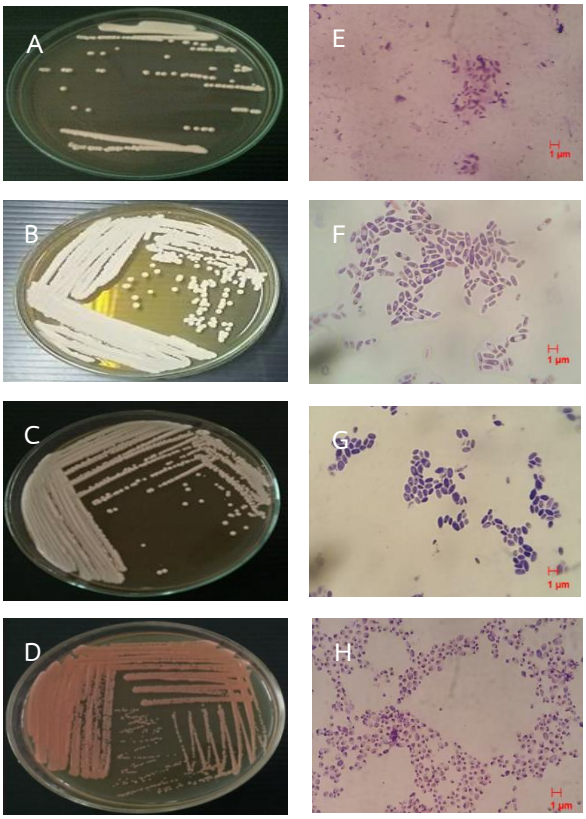

Fig. 1 Morphological characteristics (A-D) and cell shape under microscope (100X) (E-H) of BJMK02, CTWY07, CTWY19 and SCMK77

2. การเจริญในอาหาร YPD และไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด

ศึกษาการเจริญของยีสต์สะสมไขมันสูงทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPD บ่มที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 144 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อบันทึกผลการเจริญเติบโต

จาก Fig. 2 และ 3 แสดงรูปแบบการเจริญของยีสต์ สะสมไขมันสูงในอาหารสังเคราะห์ YPD และอาหารไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด พบว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารสังเคราะห์ YPD ยีสต์จะเข้าสู่ระยะ log phase ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และเข้าสู่ระยะ stationary- phase ในชั่วโมงที่ 48 และอาหารไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด ยีสต์ทุกไอโซเลตจะเข้าสู่ระยะ stationary phase ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 ขึ้นไป แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ทุกไอโซเลต มีการปรับตัวให้เข้ากับอาหารสังเคราะห์ได้ดีกว่าไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด เนื่องจากมีระยะในการปรับตัวสั้น (lag phase ใช้เวลาสั้นกว่า) และยีสต์รหัส CTWY07 และ SCMK77 เริ่มเข้าสู่ระยะ

stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96-144 ในขณะที่ยีสต์รหัส BJMK02 และ CTWY19 ในชั่วโมงที่ 144 จะเริ่มเข้าสู่ระยะ death phase ในอาหารไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด เมื่อสังเกตค่า OD_{600} พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้รวดเร็วในอาหาร YPD มากกว่าอาหารไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด โดยอาหาร YPD มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมและโมเลกุลมีขนาดเล็กง่ายต่อการที่เซลล์ยีสต์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ในขณะที่มีน้ำตาลหลายชนิดในไฮโดรไลเสทซังข้าวโพดทั้งน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (กลูโคส) และ 5 อะตอม (ไซโลสและอะราบิโนส) ซึ่งยากต่อการนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตในทันที

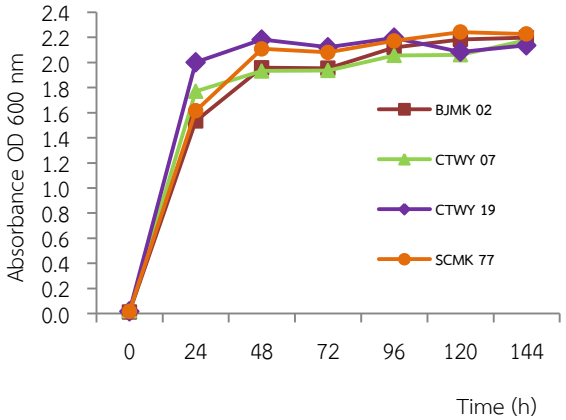

Fig. 2 Growth profile of oleaginous yeasts culture on YPD using glucose as a carbon source

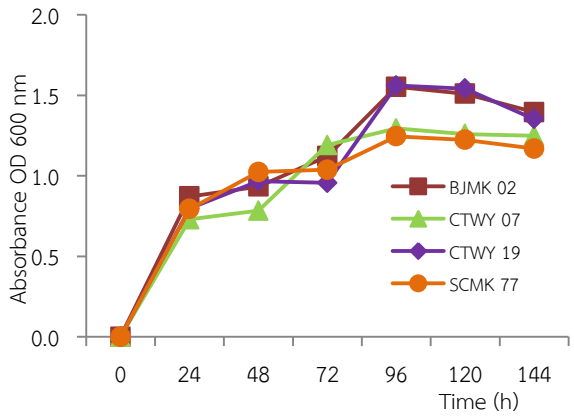

Fig. 3 Growth profile of oleaginous yeasts based on corn cob hydrolysate as a carbon source

3. การผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันสูงในอาหารไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์สะสมไขมันสูงในอาหารไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ยีสต์มีการสะสมไขมันภายในเซลล์และน้ำหนักแห้งแสดงดัง Fig. 4 และ Fig. 5

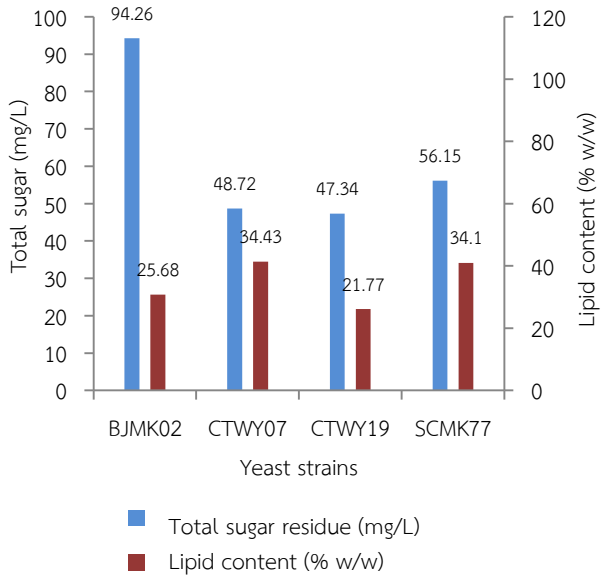

Fig. 4 Total sugar and lipid content of oleaginous yeasts during corn cob hydrolysate fermentation

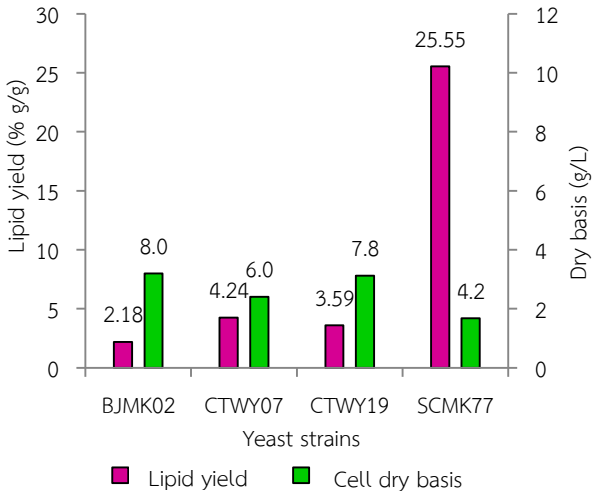

Fig. 5 Lipid yield and cell dry weight of oleaginous yeasts during corn cob hydrolysate fermentation

จากผลการทดลองในการผลิตไขมันของยีสต์สะสมไขมันสูงในอาหารไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 182.32 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงในระหว่างกระบวนการหมัก โดยพบว่า เมื่อยีสต์เจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็ว น้ำตาลทั้งหมดจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณไขมัน โดยพบว่า ยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลทั้งหมดได้ดี จะมีแนวโน้มในการผลิตไขมันสูง ยกเว้นยีสต์รหัส CTWY19 สามารถใช้น้ำตาลได้มากที่สุด แต่ปริมาณไขมันที่ผลิตได้เป็นอันดับสุดท้ายจากยีสต์สะสมไขมันสูงทั้ง 4 สายพันธุ์ เนื่องจากในการนำน้ำตาลไปใช้อาจใช้เพื่อการเจริญเติบโต และวิถีในการผลิตไขมันจะมีการสะสมสารตัวกลาง ได้แก่ ซิเตรท มาเลต และอะซิติลโค-เอ ทำให้อาจมีการส่งผ่านสารตัวกลางเพื่อเปลี่ยนเป็นไขมันได้น้อย จากผลการทดลองพบว่า ยีสต์รหัส CTWY19 จะใช้น้ำตาลทั้งหมดได้ดีที่สุดเท่ากับ 134.98 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ รหัส CTWY07 และ SCMK77 เท่ากับ 133.60 และ126.16 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณไขมันเท่ากับร้อยละ 21.77, 34.43 และ 34.10 ตามลำดับ

4. การผลิตไบโอดีเซล

ไขมันที่สกัดได้จากยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ในข้อ 2 ทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผลการทดลองแสดงใน Table 2

Table 2 Methyl ester component by oleaginous yeasts

Yeast strains	Lipid content (%)	Methyl ester				
		C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
BJMK02	25.68	2.29	25.31	6.89	49.27	11.82
CTWY07	34.43	1.30	21.56	4.82	57.53	7.28
CTWY19	21.77	1.47	21.27	9.10	54.68	11.13
SCMK77	34.10	2.01	29.60	7.23	48.91	8.19

C14:0 Myristic, C16:0 Palmitic, C18:0 Stearic, C18:1 Oleic, C18:2 Linoleic

จากผลการทดลองพบว่า กรดไขมันที่ยีสต์สะสมภายในเซลล์ประกอบด้วยกรดโอเลอิก (C18:1), ปาล์มมิติก (C16:0), ลิโนเลอิก (C18:2), ไมริสติก (C14:0) และสเตียริก (C18:0) โดยกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมา คือ ปาล์มมิติก ลิโนเลอิก ไมริสติก และสเตียริก ตามลำดับ โดยยีสต์สายพันธุ์ CTWY07 มีปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 34.43 และชนิดของกรดไขมันส่วนใหญ่ที่ยีสต์สะสมไขมันสูงทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตได้ คือ กรดโอเลอิกตั้งแต่ร้อยละ 48.91-57.53 และกรดปาล์มมิติกตั้งแต่ร้อยละ 21.27-29.60

วิจารณ์ผลการวิจัย

เหตุผลที่ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตได้ดีโดยเข้าสู่ระยะ log phase และ stationary phase ได้อย่างรวดเร็วในอาหารสังเคราะห์ YPD เนื่องจากในอาหารดังกล่าวมีแหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลกลูโคสที่ยีสต์สามารถนำมาใช้ได้ทันที โดยน้ำตาลชนิดนี้ยีสต์จะใช้เพื่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในขณะที่ไฮโดรไลเสทซังข้าวโพดมักพบน้ำตาลหลากหลายชนิด เช่น กลูโคส ไซโลส และราบิโนส โดยน้ำตาลกลูโคสพบค่อนข้างน้อย (2.9 กรัมต่อลิตร) เมื่อเทียบกับไซโลส (37.9 กรัมต่อลิตร) และอะราบิโนส (4.9 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นในการใช้เพื่อการเจริญเติบโตจึงเป็นไปได้ค่อนข้างยาก และอาจต้องใช้เวลานานในการปรับตัวเนื่องจากในระหว่างกระบวนการปรับสภาพจะมีผลผลิตหลากหลายชนิดที่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ เช่น กรดอะซิติกจากหมู่อะซีติลในเฮมิเซลลูโลส เฟอร์ฟูรอลจากน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม และ 5 - ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (5-HMF) จากน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (Chen *et al*., 2013) การเข้าสู่ระยะ stationary phase พบว่า ในระยะอาหารจะเริ่มหมดลงยีสต์จะอยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหาร ในระยะนี้อัตราการเกิดจะสมดุลกับอัตราการตาย ยีสต์จะมีอัตราการแบ่งตัวน้อย และมีการสร้างสาร secondary metabolite รวมถึงภายในเซลล์จะมีการสะสมไขมันสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกการเจริญของยีสต์ในระยะนี้เพื่อศึกษาการผลิตไขมัน

การสะสมไขมันในยีสต์จะอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่ โดยเก็บไว้ออร์กาเนลล์จำเพาะ จะเห็นได้ว่าอะซีติลโคเอที่เป็นสับสเตรทในการสร้างไขมันจะถูกเปลี่ยนแปลงได้ 2 รูปแบบ คือ กรดไขมันหรือไตรเอซิล-กลีเซอไรด์ ซึ่งผลผลิตทั้ง 2 รูปแบบนั้นต่างก็สามารถเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ โดยปกติไขมันจะมีการผสมเมื่อเซลล์ได้รับปริมาณอาหารที่มากเกินพอและเซลล์เกิดภาวะขาดแคลนไนโตรเจน ทำให้อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (AMP) ถูกย่อยสลายเป็นจำนวนมากเพื่อผลิตแอมโมเนียมาใช้ ทำให้เอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนสทำงานได้น้อยและมีการสะสมปริมาณของไอโซซิเตรทและกรดซิตริกสูงในไมโทคอนเดรีย จากนั้นกรดซิตริกจะเคลื่อนที่ไปยังไซโตซอลแล้วจึงถูกเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซีเตท และอะซีติลโคเอด้วยการทำงานของเอนไซม์เอทีพีซิเตรทไลเอส (ATP citrate lyase) นั่นหมายความว่า หากมีปริมาณอะซิติลโคเอสูงก็จะมี

การสังเคราะห์กรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอลสูงตามไปด้วย (Sriariyanan *et al*., 2014)

จากการศึกษานี้พบว่าไขมันจากยีสต์สะสมไขมันสูงสามารถเตรียมเป็นไบโอดีเซลได้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มแหล่งของน้ำมันที่สามารถนำมาเตรียมเป็นไบโอดีเซลเป็นพลังงานทางเลือกอีกแหล่งหนึ่งด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang *et al*. (2013) ได้รายงานองค์ประกอบของกรดไขมันและน้ำตาลที่ยีสต์ *Trichosporon coremiiforme* เพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสทซังข้าวโพด พบว่าในบางครั้งองค์ประกอบของไขมันที่พบอาจมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญกับอายุของเชื้อ ซึ่งผลจากยีสต์ *T. coremiiforme* พบองค์ประกอบไขมันส่วนใหญ่เป็นไขมันไม่อิ่มตัว การผลิตไขมันจะน้อยในช่วงสามวันแรก แต่อัตราการผลิตไขมันจะเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 4 ไขมันที่ส่วนใหญ่จาก *T. coremiiforme* คือ กรดปาล์มมิติก กรดโอเลอิก และกรดไลโนเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยกรดปาล์มมิติกมีประมาณร้อยละ 46.7 และเป็นองค์ประกอบที่คล้ายกับน้ำมันพืช กรดไขมันที่ผลิตจากยีสต์มากกว่าร้อยละ 60 อยู่ในรูปของกรดโอเลอิก โดยจากงานวิจัยของ Sitepu *et al*. (2014a,b) รายงานรูปแบบของไบโอดีเซลพบว่า ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบคือ กรดไมริสติกร้อยละ 1, กรดปาล์มมิติกร้อยละ 21.5, กรดสเตียริกร้อยละ 4.6, กรดโอเลอิกร้อยละ 62.1, กรดลิโนเลอิกร้อยละ 7.6, กรดโลโนเลนิกร้อยละ 0.7 และกรดไขมันชนิดอื่นๆ อีกน้อยกว่าร้อยละ 0.5

ยีสต์สะสมไขมันสูงโดยส่วนใหญ่จะสะสมไขมันในรูปของไดเอซิลกลีเซอรอล (DAG) และไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) ยีสต์สะสมไขมันสูง ได้แก่ *Rhodosporidium*, *Rhodotorulu*, *Yarrowia, Cryptococcus*, *Candida*, *Lipomyces* และ *Trichosporon* โดยส่วนใหญ่จะมีการสังเคราะห์กรดไมอิสติก, กรดปาล์มมิติก, กรดสเตียริก, กรดโอเลอิก และกรดลิโนเลอิก ซึ่งรูปแบบของกรดไขมันที่แตกต่างกันของยีสต์สะสมไขมันสูงอธิบายโดยงานทดลองของ Patel *et al*. (2015) โดยพบรูปแบบของกรดไขมันของยีสต์สะสมไขมันสูงขึ้นอยู่กับการเตรียมอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยง ตัวอย่างเช่น *Rhodosporidium toruloides*_Y4 เจริญในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสโดยมีสารยับยั้ง เช่น กรดอะซีติก, 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (HMF), ไซรินกัลดีไฮด์, เฟอร์ฟูรอล, วานิลลิน และพอลิ-ไฮดรอกซีบิวทิวเรต ซึ่งจะทำให้มีปริมาณของกรดไขมันที่แตกต่างกันระหว่างกรดไมริสติก, กรดปาล์มมิติก, กรดสเตียริก, กรดโอเลอิก, กรดลิโนเลอิก และกรดลิโนเลนิก ส่วน *R. kratochvibvae* HIMPA1 เจริญได้ใน hemp seed aqueous extract (HSAE) โดยมีรูปแบบของเมทิลเอสเทอร์ส่วนใหญ่เป็นกรดปาล์มมิติกร้อยละ 5.90, กรดสเตียริกร้อยละ 25.10, กรดโอเลอิกร้อยละ 37.5 และมีกรดไขมันเพิ่มเติม คือ กรดอะราชิดิก (C20 : 0) ร้อยละ 22 และกรดเบเฮนิก (C22 : 0) ร้อยละ 6.5 รวมทั้งกรดไขมันที่พบไม่บ่อย คือ C27 : 0 อีกร้อยละ 3

สรุปผลการวิจัย

กรดไขมันที่ผลิตจากยีสต์สะสมไขมันสูง (oleaginous yeasts) ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการสะสมไขมันในเซลล์ภายใต้อาหารที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ไฮโดรไลเสทซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน อายุเชื้อตั้งต้นอยู่ในระยะ stationary phase ทำให้ยีสต์มีการสะสมไขมันสูงภายในเซลล์ ชนิดของกรดไขมันส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกับน้ำมันจากพืช ทำให้ไขมันจากยีสต์มีศักยภาพเป็นไบโอดีเซลได้เช่นเดียวกับน้ำมันพืชโดยผ่านกระบวนการทรานสเอสเทอริฟิเคชัน

กรดไขมันหลักที่พบในยีสต์สะสมไขมันส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดปาล์มมิติก (C16:0) กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดสเตียริก (C18:0) รวมทั้งกรดไขมันชนิดอื่นๆ เช่น กรดไมริสติก (C14:0) กรดเฮปตาเลคาโนอิก (C17:0) กรดปาล์มมิโตเลอิก (C16:1) กรดลิโนเลอิก (C18:2) และกรดลิโนเลนิก (C18:3) โดยจะสะสมไขมันในรูปของหยดน้ำมันภายในเซลล์ และมีคุณสมบัติในการผลิตไบโอดีเซล นอกจากนี้ยีสต์ยังมีคุณสมบัติอื่นๆ ที่เหมาะสมในการคัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในการผลิตไขมัน คือ เจริญได้เร็วซึ่งให้ผลผลิตสูง และใช้วัตถุดิบราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ เก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่าย และสามารถสกัดน้ำมันออกจากเซลล์ได้ง่าย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยนักศึกษาระดับอุดมศึกษา สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน ประจำปีงบประมาณ 2559 ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนทุนสำหรับการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

References

Azocar, L., Ciudad, G., Heipieper, H. J., and Navia, R. 2010. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88 : 621-636.

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

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28 : 350-356.

Guo, W. J., Wang, Y., Wan, J. Q., and Ma, Y. W. 2011. Effects of slushing process on the pore structure and crystallinity in old corrugated container cellulose fibre. *Carbohydrate Polymers*. 83(1) : 1–7.

Helwani, Z., Othman, M. R., Aziz, N., Kim, J., and Fernando, W. J. N. 2009. Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol : A review. Applied Catalysis A: General. 363 : 1–10.

Huang, C., Chen, X, F., Xiong, L., Yang, X, Y., Chen, X, D., Ma, L, L., and Chen, Y. 2013. Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Biomass and Bioenergy*. 49 : 273–278.

Leesing, R. 2013. Biodiesel Production from oleaginous yeast isolated from soil in the area under the genetic conservation project due to the royal initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn in Chulaporn dam, Chaiyaphum used sweet potato as a raw material. Khonkaen : KhonKaen University. (in Thai)

Liu, B., and Zhao, Z. 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 82 : 775-780.

Liu, Y., Wang, Y., Liu, H., and Zhang, J. 2015. Enhanced Lipid production with undetoxified corncob hydrolysahe by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresource Technology*. 180 : 32-39.

Meng, X., Yang, X., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., and Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34 : 1-5.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31 : 426-428.

National Research Council of Thailand. 2011. Study on the management of waste residue in agriculture for fuel and smoke reduction. Executive Summary. (in Thai)

Patel, A., Pruthi, V., Singh, R. P., and Pruthi, P. A. 2015. Synergistic effect of fermentable and non-fermentable carbon sources enhances TAG accumulation in oleaginous yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresource Technology*. 188 : 136-144.

Samniang, A., Tipachan, C., and Kajorncheappun-ngam, S. 2014. Comparison of biodiesel production from crude Jatropha oil and Krating oil by supercritical methanol transesterification. *Renewable Energy*. 68 : 351-355. (in Thai)

Sirisansaneeyakul, S. 2011. Biodiesel from microbial oils. Thai Society for Biotechnology. 1(2) : 19. (in Thai)

Sriariyanan, M., Petsom, J., and Kongrueng, S. 2014. Lipid production for second generation biodiesel by oleaginous yeast. *Journal of Science and Technology MSU*. 33(3) : 300-306. (in Thai)

Sitepu, I. R., Garay, L. A., Sestric, R., Levin, D., Block, D. E., German, J. B., and Boundy, M. K. L. 2014a. Oleaginous yeasts for biodiesel : Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*. 32 : 1336–1360.

Sitepu, I. R., Selby, T., Lin, T., Zhu, S., and Boundy,- M. K. L. 2014b. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 41 : 1061–1070.

Thancharoen, K., Malasri, A., Leamsingkron, W., and Booyalit, P. 2017. Selection of oleaginous yeasts with lipid accumulation by the measurement of Sudan black B for Benefits of biodiesel. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*. 6(2) : 53-57.

Zhang, Y., Dube, M. A., McLean, D. D., and Kates, M. 2009. Biodiesel production from waste cooking oil : Economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresource Technology*. 90(3) : 229-240.

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