โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง

ชื่อนิสิต นางสาวภัทราทิพย์ คล่องแคล่ว รหัสประจำตัว 5932342123

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง
โดย	นางสาวภัทราทิพย์ คล่องแคล่ว รหัสนิสิต 5932342123
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นราพร สมบูรณ์นะ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร

นิสิตในโครงการ

นางสาวภัทราทิพย์ คล่องแคล่ว

รหัสประจำตัว 5932342123

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

ชื่อโครงการ	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง
ชื่อนิสิตผู้นำเสนอโครงการ	นาวสาวภัทราทิพย์ คล่องแคล่ว
เลขประจำตัวนิสิต	5932342123
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

การผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง เมื่อเติมสารอาหารรอง ($MgSO_4$, NaCl, $CaCl_2$) การปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 1:1,664 ด้วยสารสกัดจากยีสต์ และ peptone ให้ผลผลิตน้ำมันมากกว่าการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วยสารสกัดจากยีสต์และ $(NH_4)_2SO_4$ หรือสารสกัดจากยีสต์ และ KNO_3 แต่น้อยกว่าการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วย peptone เพียงอย่างเดียว ไม่พบความแตกต่างของผลผลิตน้ำมันระหว่าง การใช้ peptone และ polypeptone แต่ถ้าไม่เติมสารอาหารรอง การปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 1:1,664 ด้วยสารสกัดจากยีสต์เพียงอย่างเดียวได้ผลผลิตน้ำมันสูงที่สุด (2.28 กรัม/ลิตร) สูงกว่าเติมสารอาหารรองและการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วย peptone (1.67 กรัม/ลิตร) หรือสารสกัดจากยีสต์ และ peptone (1.53 กรัม/ลิตร) จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่าการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังนั้นไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารรอง โดยสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับใช้ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการเพิ่มผลผลิตน้ำมัน

คำสำคัญ: สารสกัดจากยีสต์, สารอาหารรอง, อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Project title Effect of Nitrogen Source on *Cyberlindnera subsufficiences* NG 8.2 Oil Production from Cassava Starch Hydrolysate

Investigator Ms. Pattrathip Klongklaeo

ID 5932342123

Project advisor Prof. Ancharida Svarachorn, Ph.D.

Abstract

Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2 oil production from cassava starch hydrolysate supplemented with micronutrients ($MgSO_4$, NaCl, $CaCl_2$) and carbon-nitrogen ratio adjusted to 1:1,664 by yeast extract and peptone yielded higher oil yield than yeast extract and $(NH_4)_2SO_4$ or yeast extract and KNO_3, but lower oil yield than peptone. There was no difference of oil yield when peptone or polypeptone was used. The highest oil yield was obtained from cassava starch hydrolysate without supplementation of micronutrients and carbon-nitrogen ratio adjusted to 1:1,664 by yeast extract (2.28 g/l). The oil yield was higher than using of peptone (1.67 g/l) or yeast extract and peptone (1.53 g/l) to adjust carbon- nitrogen ratio of cassava starch hydrolysate supplemented with micronutrients. Based on these results, production of *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 oil from cassava starch hydrolysate did not require micronutrients supplementation. Yeast extract was optional nitrogen source for carbon-nitrogen ratio adjustment to increase oil yield.

Keyword: yeast extract, micronutrients, carbon-nitrogen ratio

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ถือเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาประจำโครงการ

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือ และให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่มอบความรู้ และแง่คิดต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งส่งผลให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ ๆ ห้อง 1804/15 สอนสิ่งต่าง ๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือที่ให้ความช่วยเหลือมาเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ ที่ศูนย์วิจัยที่คณะเภสัชศาสตร์ ที่ช่วยดูแลการใช้เครื่อง Lyophilized และให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยดูแล ให้กำลังใจ ให้คำแนะนำและการสนับสนุนทางการศึกษาอย่างเต็มที่

ขอบคุณเพื่อนๆ จุลชีววิทยา จุฬาฯ รุ่น 43 พี่ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา

ท้ายที่สุด ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบโอกาสและประสบการณ์การเรียนรู้ในการทำวิจัยนี้

นางสาวภัทราทิพย์ คล่องแคล่ว

สารบัญ

เรื่อง หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญรูปภาพ.....ฉ

สารบัญตาราง.....ซ

บทที่ 1 บทนำ

ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ.....1

วัตถุประสงค์ของโครงการ.....11

บทที่ 2 เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์

อุปกรณ์ที่ใช้ในกาทดลอง.....12

เคมีภัณฑ์.....13

เอนไซม์.....14

เชื้อจุลินทรีย์.....14

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

การเตรียมไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง.....15

การเตรียมเชื้อเริ่มต้น.....15

การผลิตน้ำมันของยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2.....16

เรื่อง หน้า

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและสารอาหารรองต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์
Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2....16
การสกัดน้ำมันของยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2....17
การวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2....17
การคำนวณหาปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลหผลิตน้ำมัน....18
บทที่ 4 ผลการทดลอง
ผลการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง....19
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2....28
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง....29
เอกสารอ้างอิง....31
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ....34

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ หน้า

ภาพที่ 1 โรคหลอดเลือดหัวใจ....3

ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบไขมันดีและไขมันไม่ดี....5

ภาพที่ 3 ไขมันภายในหลอดเลือด....6

ภาพที่ 4 ผลซีบัคธอร์น แมคคาเดเมีย และผลอะโวคาโด....6

ภาพที่ 5 โครงสร้างของกรดปาลมิโตเลอิก....7

ภาพที่ 6 แผนผังแสดงการสังเคราะห์กรดไขมัน (Chung Chan et al.,2011)....8

ภาพที่ 7 วิถีชีวสังเคราะห์ไขมันของเซลล์ยีสต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (Patel et al., 2016)....10

ภาพที่ 8 แป้งมันสำปะหลัง....10

ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์, peptone และสารอาหารรองแต่แปรผัน peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนอื่น....21

ภาพที่ 10 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์, peptone และสารอาหารรองแต่แปรผัน peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนอื่น....21

ภาพที่ 11 ปริมาณน้ำมันในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์และสารอาหารรองแต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น....24

ภาพที่ หน้า

ภาพที่ 12 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงใน อาหารไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์และสารอาหารรอง แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น.....24

ภาพที่ 13 ปริมาณน้ำมันในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงใน อาหารไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น.....27

ภาพที่ 13 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงใน อาหารไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น.....27

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์, peptone และสารอาหารรอง แต่แปรผัน peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น.....20

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำมันในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์และสารอาหารรอง แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น.....23

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำมันในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น.....26

ตารางที่ 4 องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2.....28

บทที่ 1

บทนำ

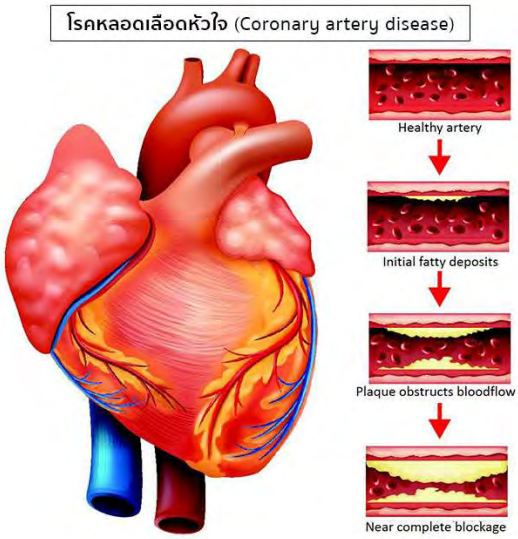
ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

โรคหัวใจและหลอดเลือดถือเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประชากรทั่วโลก ทำให้เกิดความบกพร่องในภาวะสุขภาพ (morbidity) หรือการเสียชีวิต (mortality) โดยผ่านทางสาเหตุหลักๆ ได้แก่ โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Ischemic Heart Disease: IHD) หรือโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease หรือ stroke) และภาวะหัวใจล้มเหลว (Congestive Heart Failure: CHF) ในทุก ๆ กลุ่มประเทศทั่วโลกนั้น พบสาเหตุการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจมากมาย ซึ่งอาจอธิบายง่ายๆ ว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเริ่มต้นด้วยการมีปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ที่จะเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง เช่น ความดันโลหิตสูง เบาหวาน ภาวะไขมันในเลือดสูง บุหรี่ โรคอ้วน เป็นต้น ทำให้มีพยาธิสภาพที่หลอดเลือด เมื่อโรคดำเนินมานานพอสมควรและหลอดเลือดตีบลงจนถึงจุดหนึ่งก็อาจจะเริ่มเกิดอาการขึ้น โดยอาการส่วนมากที่พบคืออาการเจ็บเค้นอก (angina pectoris) จากการที่เลือดไปเลี้ยงหัวใจไม่เพียงพอระหว่างการออกแรง หรือมีอาการเหนื่อย (dyspnea) ซึ่งเกิดจากการทำงานผิดปกติของกล้ามเนื้อหัวใจที่ขาดเลือด อาการดังกล่าวอาจเป็นๆ หายๆ และคงที่ (stable angina) หรืออาการเป็นมากขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งในด้านความรุนแรงและความบ่อยจนอาจเกิดอาการแม้ขณะทำกิจวัตรเพียงเล็กน้อยหรือขณะพักที่เรียกว่า แอนใจน่าชนิดไม่คงที่ (Unstable Angina: UA) ในบางรายผู้ป่วยอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนร้ายแรงคือโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลันสาเหตุเกิดจากหลอดเลือดหัวใจอุดตันหรือตีบอย่างรุนแรงชนิดเฉียบพลัน (acute myocardial infarction หรือ Acute MI: AMI) จะมีการเปลี่ยนแปลงกราฟไฟฟ้าหัวใจเป็นชนิด ST segment ยก (STEMI) หรือชนิดที่ ST segment ไม่ยก (NSTEMI) ซึ่งบ่อยครั้งที่อาการผู้ป่วยในกลุ่มโรค Acute Coronary Syndrome (ACS) ซึ่งได้แก่ STEMI, UA และ NSTEMI นี้รุนแรงมากถึงขั้นเสียชีวิตเฉียบพลันได้หรือมีผลทำให้กล้ามเนื้อหัวใจเสื่อมสภาพจนเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง (congestive heart failure)

ในระยะเวลาต่อมา ทางข้อมูลสถิติขององค์กรอนามัยโลกในปี 2553 พบว่ามีผู้เสียชีวิตจากโรคหลอดเลือดหัวใจ 7.2 ล้านราย (คิดเป็นร้อยละ 12.2) ของสาเหตุการเสียชีวิตทั้งหมด สำหรับจำนวนผู้ป่วยโรคหัวใจในประเทศไทย สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขได้รายงานว่ามี แนวโน้มอัตราผู้ป่วยเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลสูงขึ้นจากอัตรา 56.5 ต่อ 100,000 ประชากรในปี 2528 เพิ่มเป็น 793.03 ต่อ 100,000 ประชากร ในปี 2552 โดยมี

อัตราตายอยู่ที่ประมาณ 21-23 รายต่อ 1,000 ประชากร เช่นเดียวกับข้อมูลของสถาบันโรคทรวงอกที่ได้รายงานถึงจำนวนผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่เข้ารับการรักษาซึ่งมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ เช่นกัน จาก 23,687 ราย ในปี 2548 เป็น 32,631 ราย ในปี 2552 ในขณะที่ปี 2554 มีผู้ป่วยหลอดเลือดหัวใจตีบรายใหม่ จำนวน 21,782 ราย คิดเป็นอัตรา 33.94 ต่อ 100,000 ประชากร โดยจำนวนนี้เป็นผู้ป่วยกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน 4,099 ราย (ร้อยละ18.2) และอาการ unstable angina 1,885 ราย (ร้อยละ 8.6) ตามลำดับ และพบว่าอัตราป่วยสูงสุดอยู่ในกลุ่มอายุ >60 ปี (197.19 ต่อ 100,000 ประชากร) (Thailand Medical Services Profile, 2014)

และในระยะเวลาต่อมา ทางองค์การอนามัยโลก (WHO) เปิดเผยว่า ในปีพ.ศ. 2558 กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 ของคนทั่วโลก โดยมีผู้เสียชีวิตจากโรคหัวใจและหลอดเลือดประมาณ 17.7 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 31 ของอัตราการตายทั่วโลก ประเทศไทยจากรายงานสถิติสาธารณสุขกระทรวงสาธารณสุข พบอัตราตายจากโรคหลอดเลือดหัวใจต่อประชากร 100,000 คน ปีพ.ศ. 2555 – 2559 เท่ากับ 23.4, 26.9, 27.8, 29.9 และ 32.3 ตามลำดับ และอัตราผู้ป่วยด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจต่อประชากร 100,000 คน ปี 2554 – 2558 เท่ากับ 412.70, 427.53, 431.91, 407.70 และ 501.13 ตามลำดับ จากข้อมูลทั้งการตายและป่วยด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจ แสดงให้เห็นว่าโรคหลอดเลือดหัวใจยังคงมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น เพราะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และในสถานการณ์ปัจจุบัน กรมการแพทย์ปี 2557 พบประเทศไทยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเฉลี่ยของผู้ป่วยโรคหัวใจถึง 6,906 ล้านบาทต่อปีและยังเป็นสาเหตุของการสูญเสียปีสุขภาวะในอันดับต้นๆของประชากรไทยวัยทำงาน ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากร และเกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการเสียชีวิตก่อนวัยอันควร รวมถึงส่งผลกระทบทั้งในระดับบุคคล ครอบครัว สังคม และประเทศชาติอีกด้วย (ประเด็นสารรณรงค์วันหัวใจโลก ปี 2561, 2018)



ภาพที่1 โรคหลอดเลือดหัวใจ

ในปัจจุบันพบว่าสาเหตุของการเสียชีวิตของคนไทยที่ไม่ใช่อุบัติเหตุ มาจากโรคหัวใจและหลอดเลือดสูงเป็นอันดับ 2 เป็นรองเพียงแค่โรคมะเร็งเท่านั้น และจากตัวเลขจากกระทรวงสาธารณสุข ยังบ่งชี้ด้วยว่า ในช่วงระยะ 10 ปี ที่ผ่านมา คนไทยเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือดกว่า 3 หมื่นคน คิดเป็นเฉลี่ยชั่วโมงละเกือบ 4 คน และมีแนวโน้มการเสียชีวิตด้วยโรคนี้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะ **“โรคเส้นเลือดหัวใจตีบตัน”** ที่ปัจจุบันคนไทยมีอัตราการเกิดโรคนี้มากสุด และเป็นสาเหตุของการตายอันดับต้นๆ ของเมืองไทย

ซึ่งจากการศึกษาในประเทศไทยพบว่า ผู้ที่อยู่ในกลุ่มอาการเมตาบอลิก (Metabolic Syndrome) หรือกลุ่มอาการที่สืบเนื่องจากความอ้วนลงพุง เป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นถึง 1.7 เท่า ยิ่งกว่านั้นผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานจะเพิ่มโอกาสในการเป็นมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นถึง 3.5 เท่า ในส่วนของผู้ป่วยที่เป็นทั้งเบาหวานและกลุ่มอาการเมตาบอลิกจะมีโอกาสในการเป็นมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นถึง 4.9 เท่า

ส่วนสาเหตุของการเกิดโรคเส้นเลือดหัวใจตีบตันพบว่าอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่เข้าไปเกี่ยวข้อง ซึ่งจากข้อมูลการศึกษา Thai Registry in Acute Coronary Syndrome (TRACS) ปัจจัยเสี่ยงที่พบบ่อยในคนไทยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจ คือ ภาวะไขมันในเลือดสูง ร้อยละ 83.2 ภาวะความดันโลหิตสูงร้อยละ 59.5 เบาหวาน ร้อยละ 50.7 การสูบบุหรี่ ร้อยละ 32.1 และครอบครัวมีประวัติโรคหลอดเลือดหัวใจ ร้อยละ 9.3 จะเห็นได้ว่าสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการมีพฤติกรรมสุขภาพที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากการบริโภคของคนไทยเปลี่ยนไป โดยหันมานิยมอาหารจานด่วน ที่มีไขมันและคาร์โบไฮเดตมากขึ้น ขณะเดียวกันการเป็นสังคมเมืองทำให้การออกกำลัง

กายน้อยลงและมีความเครียดมากกว่าอดีต

“การเสียชีวิตของคนไทย จะมาจากสาเหตุการเกิดอุบัติเหตุ มาอันดับแรก รองลงมาเป็นโรคมะเร็ง และโรคหัวใจ ซึ่งโรคหัวใจที่คนไทยเป็นมากที่สุดในปัจจุบันก็คือ โรคหัวใจจากเส้นเลือดตีบตัน เนื่องจากคนไทยสมัยนี้ชอบทานอาหารฝรั่งพวกไขมันสูง อีกทั้งยังเป็นโรคกรรมพันธุ์อีกด้วย”

โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตันนั้น เกิดจากความเสื่อมของเส้นเลือด ผลจากการมีไขมันและการสะสมของหินปูนไปเกาะเส้นเลือดแดง จนเกิดการอุดตันหรือเส้นเลือดแตกเกิดขึ้น จึงส่งผลให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดไปเลี้ยง บางรายอาจทำให้เสียชีวิตแบบเฉียบพลันได้ ส่วนเหตุที่ทำให้หลอดเลือดหัวใจเสื่อม เกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น การสูบบุหรี่ ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง โรคเบาหวาน และโรคอ้วน เป็นต้น

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (Dyslipidemia) หมายถึง ภาวะที่ระดับไขมันผิดปกติในเลือด เป็นภาวะที่ร่างกายมีระดับไขมัน ในเลือดต่างไปจากเกณฑ์ที่เหมาะสม โดยเกณฑ์ปกติของระดับไขมันในเลือด คือ

- ระดับคอเลสเตอรอลรวม (Total cholesterol) น้อยกว่า 200 มิลลิกรัม/เดซิลิตร
- ระดับ HDL ไขมันดี มากกว่า 60 มิลลิกรัม/เดซิลิตร
- ระดับ LDL ไขมันไม่ดี น้อยกว่า 130 มิลลิกรัม/เดซิลิตร

ซึ่งหากไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่ควรจะเป็น จะส่งผลให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคเกี่ยวกับเลือดต่าง ๆ ตามมา โดยความผิดปกติของระดับไขมันในเลือดมีได้หลายรูปแบบได้แก่

1. ระดับคอเลสเตอรอลรวม (total cholesterol, TC) สูงในเลือด

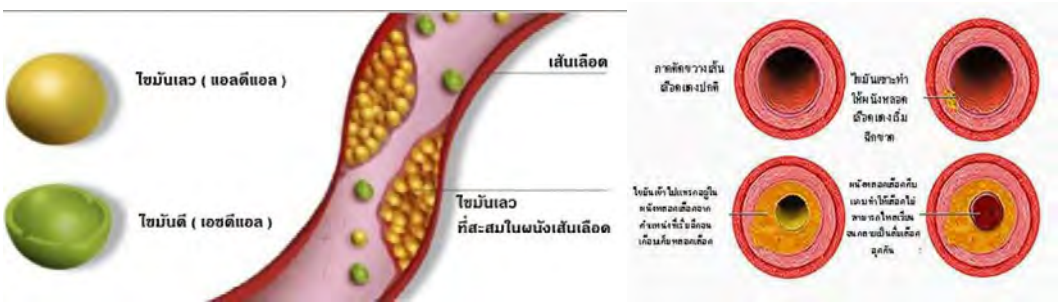
โดยคอเลสเตอรอล (Cholesterol) นั้นถือเป็นไขมันชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อร่างกาย เช่น เป็นสารตั้งต้นผลิตฮอร์โมนบางชนิด และเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งหากภายในร่างกายมีปริมาณคอเลสเตอรอลมากเกินไป อาจจะก่อเกิดโทษร้ายได้ โดยคอเลสเตอรอลในเลือดสูง อาจเกิดจาก Lipoprotein ที่สูงได้ 2 ชนิด

ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบไขมันดีและไขมันไม่ดี

HDL มาจากคำว่า high density lipoprotein (ไขมันดี) คือ ไขมันที่มีความหนาแน่นสูง เป็นไขมันที่ดีสำหรับหลอดเลือดแดงเพราะจะป้องกันไม่ให้ไขมันที่ไม่ดี คือ โคเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์ และ LDL ไปพอกสะสมในหลอดเลือดแดง ถ้ามีระดับ HDL ในเลือดต่ำ ก็จะเพิ่มโอกาส เพิ่มปัจจัยเสี่ยงในการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง เช่น โรคหลอดเลือดสมองหรือ หลอดเลือดหัวใจตีบ เป็นต้น ระดับปกติในผู้ที่ยังไม่เป็นโรคหลอดเลือดแดงแข็งควรจะไม่ต่ำกว่า ๔๐ มก./ดล. ระดับ HDL ในเลือดของคุณอยู่ในระดับสูงกว่าปกติ ซึ่งเป็นผลดี

LDL มาจากคำว่า Low Density Lipoprotein (ไขมันไม่ดี) มีความสัมพันธ์ชัดเจนกับการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นไขมันที่สามารถทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัวได้ ไขมัน LDL ทำหน้าที่ลำเลียงคอเลสเตอรอลทั้งหลายออกจากตับเข้าสู่กระแสเลือดในร่างกาย หากคอเลสเตอรอลเหลืออยู่ในกระแสเลือด ก็จะสะสมเป็นตุ่มเกาะอยู่ตามผนังของหลอดเลือดทำให้หลอดเลือดแข็ง เกิดภาวะหลอดเลือดตีบ นานเข้าก็จะทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดอุดตัน และส่งผลต่อการเป็นโรคความดันสูง โรคหัวใจขาดเลือด ไตวาย อัมพาตอัมพฤกษ์ เป็นต้น

2. ระดับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride, TG) สูงในเลือด
3. ระดับไขมันผิดปกติแบบใดแบบหนึ่งร่วมกัน 2 อย่างขึ้นไป



ภาพที่ 3 ไขมันภายในหลอดเลือด

กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid) หรือโอเมก้า 7 (mega-7 monounsaturated fatty acid) ถือเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบได้มากในน้ำมันที่สกัดจากถั่วแมคคาเดเมีย และน้ำมันสกัดซีบัคธอร์น ปัจจัยหลักของภาวะบกพร่องของระบบเผาผลาญก็คือ การที่ร่างกายขาดหรือได้รับกรดปาล์มิโตเลอิก จากอาหารน้อยเกินไปจนไม่พอ การบริโภคกรดปาล์มิโตเลอิก เพิ่มจะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรค เพิ่ม HDL ลดการอักเสบที่อาจส่งผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งอาหารที่พบกรดปาล์มิโตเลอิก คือ ซีบัคธอร์น, ถั่วแมคคาเดเมีย, อะโวคาโด, แซลมอน

ก ข ค

ภาพที่ 4 ก.ผลซีบัคธอร์น ข.ถั่วแมคคาเดเมีย ค.ผลอะโวคาโด

โดยประโยชน์ของกรดปาล์มิโตเลอิก มีหลายข้อได้แก่

ข้อแรก คือ จะช่วยลดความยุ่งยากในการควบคุมน้ำหนัก กรดปาล์มิโตเลอิกจะป้องกันร่างกายไม่ให้สะสมไขมัน แต่มีผลพิสูจน์จากการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในญี่ปุ่น งานวิจัยแสดงให้เห็นว่า กรดปาล์มิโตเลอิกประสบ

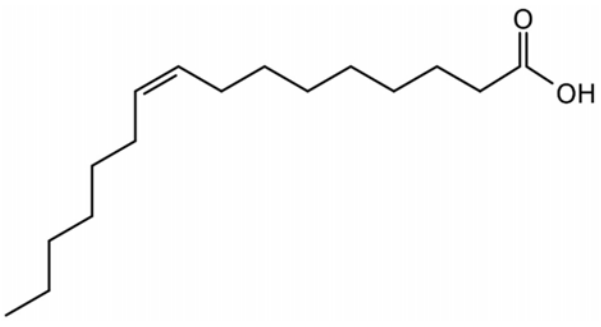
ความสำเร็จในการลดไขมันและการกำจัดไขมัน สารมหัศจรรย์นี้ยังเพิ่มความไวของอินซูลินในร่างกายเร่งการเผาผลาญ ดังนั้นแทนที่จะเก็บกลูโคสในร่างกายเป็นไขมันจะเปลี่ยนเป็นพลังงานและทำให้ควบคุมน้ำหนักได้ง่ายขึ้น

ส่วนข้อสอง คือ จะช่วยเสริมสร้างหลอดเลือดดำ โดยกรดปาล์มิโตเลอิก มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลที่ไม่ดีที่ไหลเวียนในหลอดเลือดดำและช่วยรักษาความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือด ทำให้ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบตันได้

ข้อสาม คือ จะมีผลดีต่อน้ำตาลในเลือดและการเผาผลาญของอินซูลิน เป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำตาลในเลือดสามารถควบคุมได้ง่ายขึ้นและระดับคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี ไตรกลีเซอไรด์จะลดลงในหนูที่เป็นเบาหวานเนื่องจากการเสริมกรดปาล์มิโตเลอิก ซึ่งการสะสมไขมันในตับจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญและที่สำคัญกว่านั้นกระบวนการอักเสบที่เรียกว่า โรคหลอดเลือดมีอาการดีขึ้น

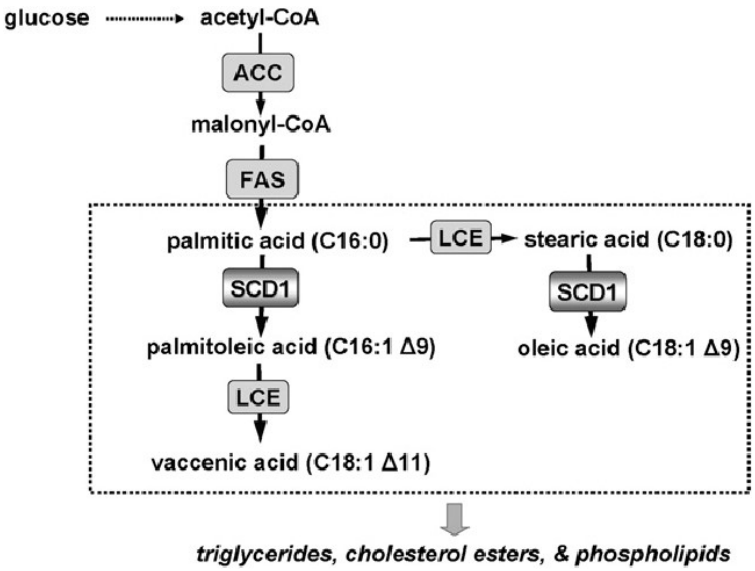
ข้อสุดท้าย คือ จะช่วยต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพและต้านการอักเสบ กรดปาล์มิโตเลอิกจะผลิตคอลลาเจนซึ่งมีความสำคัญต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในร่างกาย จะช่วยเร่งกระบวนการฟื้นฟูและรักษาเซลล์ ด้วยคุณสมบัติต้านการอักเสบนั้น จะทำการป้องกันการอักเสบในร่างกายและเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน สารต้านอนุมูลอิสระในแคโรทีนอยด์นั้นมีประโยชน์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งแคโรทีนอยด์มีความโดดเด่นเป็นพิเศษในการรักษาโรคจุดเหลืองและต้อกระจก

จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ ที่จะพยายามค้นหาแหล่งของกรดปาล์มิโตเลอิก เพื่อนำมาใช้รักษาโรคที่มีไขมันในเลือดสูง เป็นสาเหตุสำคัญ ได้แก่ ไขมันอุดตันในเส้นเลือดและนำมาสู่โรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด (Passos et al.,2016)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของกรดปาลมิโตเลอิก

กรดปาล์มิโตเลอิก หรือ hexadec-9-enoic หรือ โอเมก้า 7 เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวที่มีสูตร $CH_3(CH_2)_5CH = CH(CH_2)_7COOH$ เป็นส่วนประกอบที่พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ ถูกสังเคราะห์โดยการทำงานของเอนไซม์ Stearoyl-CoA



ภาพที่ 6 แผนผังแสดงการสังเคราะห์กรดไขมัน (Chung Chan et al., 2011)

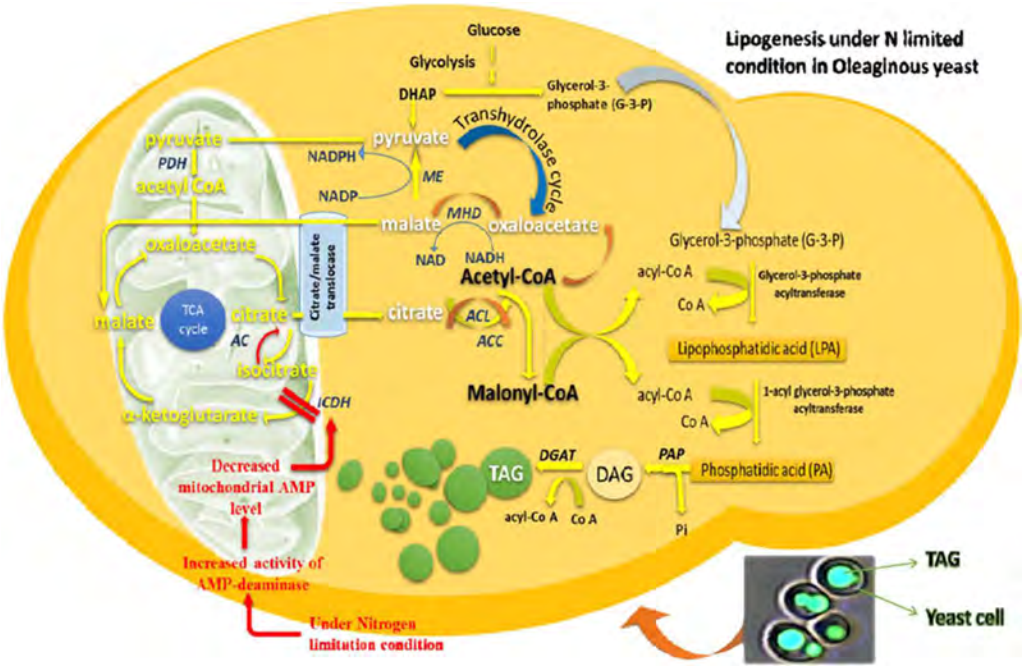
กรดปาลมิโตเลอิก นอกจากจะสามารถสร้างได้เองจากร่างกายมนุษย์ แล้วยังสามารถพบได้ในผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด แต่ด้วยความจำกัดของปริมาณและการควบคุมคุณภาพของผลผลิต ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น สภาพภูมิอากาศ เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกมาก ใช้แรงงานในการผลิต การเก็บเกี่ยวผลผลิต และการขนส่งผลผลิตมาก ทำให้ราคาของกรดปาลมิโตเลอิกเพิ่มสูงขึ้นมาก ดังนั้นจึงมีความต้องการที่จะหาแหล่งผลิตใหม่ ซึ่งก็คือจุลินทรีย์ จุลินทรีย์สามารถผลิตน้ำมันได้ตลอด ไม่ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ สภาพแวดล้อมภายนอก ใช้พื้นที่น้อยในการผลิต ขยายส่วนการผลิตได้ง่าย

การผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์ถือเป็นแหล่งน้ำมันทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจ เรียกจุลินทรีย์ที่สะสมน้ำมันในเซลล์ได้มากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในสภาวะที่มี carbon source สูง และมี nitrogen source ต่ำ ว่า “จุลินทรีย์อุดมน้ำมัน” (oleaginous microorganism) เรียกน้ำมันที่ได้ว่า “น้ำมันเซลล์เดี่ยว” (single cell oil, SCO) (Ming Hua Liang et al., 2013) โดยยีสต์ถือเป็นจุลินทรีย์อุดมน้ำมันที่น่าสนใจและมีศักยภาพอย่างยิ่ง

เนื่องจากยีสต์มีการเจริญที่รวดเร็ว เป็นเซลล์เดี่ยว ทำให้การแยกและสกัดน้ำมันทำได้ง่าย ยีสต์สามารถเจริญในแหล่งอาหารที่หลากหลาย เช่น ไฮโดรไลเซตของแป้ง (starch hydrolysate) กลีเซอรอล เป็นต้น ไม่ต้องการแสงในการเจริญ และไม่ไวต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนั้นน้ำมันที่ยีสต์ผลิตยังมีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็น triacylglycerol หรือ TAG ที่คล้ายกับน้ำมันของพืช

ยีสต์โดยทั่วไปผลิตและสะสมไขมันภายในเซลล์ประมาณ 6-8% ของน้ำหนักแห้ง โดยไขมันที่ผลิตเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Schulz et al.,2014) ในบางสภาวะ เช่น สภาวะที่มี carbon source สูง และมี nitrogen source ต่ำ หรือสภาวะที่มี carbon source สูง แต่มี phosphate ต่ำ ยีสต์บางชนิดสามารถผลิตและสะสมไขมันมากถึง 20% ของน้ำหนักแห้งและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ ในสภาพหยดน้ำมัน (oil droplet) เรียกยีสต์กลุ่มนี้ว่า ยีสต์อุดมน้ำมัน (oleaginous yeast) ทั้งนี้เพราะยีสต์เปลี่ยนการใช้แหล่งคาร์บอนจากการใช้เพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวนเป็นการใช้เพื่อการสังเคราะห์ triacylglycerol เพราะในสภาวะดังกล่าวนี้เอนไซม์ isocitrate dehydrogenase (ICDH) ไม่สามารถเปลี่ยน isocitrate เป็น α-ketoglutarate จึงเกิดการสะสมของ isocitrate ซึ่ง isocitrate นี้สามารถเปลี่ยนไปเป็น citrate เมื่อปริมาณของ citrate ใน mitochondria สูง จะถูกส่งออกไปที่ cytosol แล้วเปลี่ยนเป็น oxaloacetate, acetyl Co-A แล้วเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์น้ำมันต่อไป (ภาพที่ 7) ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ผลิต คือ อายุของเชื้อ ค่าความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิที่เจริญ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (อินทรีย์ อนินทรีย์) สารอาหารรองเช่น Mg^{+2}, Ca^{+2} เป็นต้น กรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ คือ palmitoleic acid (C16:1), palmitic acid (C16:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), และ steric acid (C18:0) (Wasylenko et al., 2015)

Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2 เป็นยีสต์อุดมน้ำมันที่แยกได้จากดินในประเทศไทย พบว่าน้ำมันที่ยีสต์ไอโซเลตนี้ผลิตและสะสมภายในเซลล์มีปริมาณกรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid) เป็นองค์ประกอบสูงถึง 22.25% (Pranimit, 2017)



ภาพที่ 7 วิถีชีวสังเคราะห์ไขมันของเซลล์ยีสต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนจำกัด (Patel et al., 2016)

เนื่องจากประเทศไทยมีผลผลิตมันสำปะหลังเฉลี่ยมากถึง 30 ล้านตันต่อปี (Talad App, 2020) จึงสนใจที่จะผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 โดยใช้ไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งพบว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงแต่มีไนโตรเจนต่ำเป็นวัตถุดิบ

ภาพที่ 8 แป้งมันสำปะหลัง

วัตถุประสงค์ของโครงการ

ศึกษาการผลิตน้ำมันของ *Cyberlindnera subsufficiens* NG8.2 จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง

- ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน
- ความจำเป็นในการเติมสารอาหารรอง

บทที่ 2

เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A.

2. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated incubator shaker) รุ่น innova® 4300 บริษัท New Brunswick Scientific, USA

3. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG6002-S บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-352 และ ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Japan และรุ่น HV-25 บริษัท HiRaYaMa, Japan

6. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA

7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan

8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge) รุ่น 5922 บริษัท Kubota, Japan

9. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้สำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก (high speed refrigerated microtube centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan

10. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) รุ่น EYELA FD-1 บริษัท Tokyo Rikakikai, Japan

11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่นS-20K บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S-UV-VIS บริษัท

Thermo Scientific Inc, USA

13. เครื่องวิเคราะห์สารชีวเคมี (biochemistry analyzer) รุ่น 7100 MBS บริษัท YSI, USA

14. ตู้ดูดไอสารระเหยสารเคมี (fume Hood) บริษัท Flexlab, Thailand

15. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) บริษัท Lab service, Thailand

16. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand

17. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร

บริษัท Eppendorf, Thailand

18. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 5000 ไมโครลิตร บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

19. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น SS40-D บริษัท Grant Instrument, UK

20. อ่างส่งคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น Elma E30H บริษัท Tovatech, USA

เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: HCl) บริษัท Sigma Inc, Germany

2. กลูโคส (D-glucose: C6H12O6) บริษัท Sigma Inc, Germany

3. คลอโรฟอร์ม (chloroform: CHCl3) บริษัท V.S. Chem house, Bangkok

4. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

6. เพปโทน (peptone) บริษัท Becton Co. Ltd, Germany

7. โพลิเพปโทน (peptone) บริษัท Becton Co. Ltd, Germany

8. โพแทสเซียมไนเตรต (potassium nitrate: KNO_3) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

9. เมทานอล (methanol: CH_3OH) บริษัท V.S. Chem house, Bangkok

10. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate: MgSO4•7H2O) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

11. วุ้นผง (agar) บริษัท Becton, USA

12. สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท Becton, Dickinson & Company, USA

13. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Becton Co. Ltd, Germany

14. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate: $(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany

เอนไซม์

1. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) 220,000 ยูนิต/มิลลิลิตร บริษัท Siam Victory Chemicals Co. Ltd, Thailand

2. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (**α**-amylase) 120,000 ยูนิต/มิลลิลิตร บริษัท Siam Victory Chemicals Co. Ltd, Thailand

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 คัดแยกได้จากดิน จังหวัดระนอง (Pranimit, 2017)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง

ทำโดยแขวนลอยแป้งมันสำปะหลัง 20 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 5.8 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) 270 ไมโครลิตร บ่มที่ 85 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่า pH เป็น 4.5 เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) 90 ไมโครลิตร บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใส (supernatant) มากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์1

3.2 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ย้ายโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 10 กรัม/ลิตร สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 3 กรัม/ลิตร สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) 3 กรัม/ลิตร เพปโทน (peptone) 5 กรัม/ลิตร และ วุ้นผง 20 กรัม/ลิตร pH 5.5 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในอาร์มฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เป็น 0.8 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายยีสต์ 10% ปริมาตร/ปริมาตร มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร ในอาร์มฟาสก์ขนาด 250 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตน้ำมันต่อไป

3.3 การผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

นำเชื้อเริ่มต้นมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวผลิตน้ำมัน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophylization)

3.4 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและสารอาหารรองต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์

***Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2**

3.4.1 ผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 โดยใช้อาหารเหลวผลิตน้ำมันที่ประกอบด้วยไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง 1000 มิลลิลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัม เพปโตน (peptone) 0.138 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Mg_2SO_4•7H_2O$) 0.5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2•2H_2O$) 0.1 กรัม ปรับค่า pH เป็น 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนโดยแปรผัน peptone 0.138 กรัม/ลิตร เป็น polypeptone 0.162 กรัม/ลิตร หรือ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม/ลิตร หรือ KNO_3 0.154 กรัม/ลิตร กำหนดให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเหลวผลิตน้ำมันเป็น 1:1,664 (Pranimit และคณะ 2019)

3.4.2 ผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 โดยใช้อาหารเหลวผลิตน้ำมันที่ประกอบด้วยไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง 1000 มิลลิลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.295 กรัมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($Mg_2SO_4•7H_2O$) 0.5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2•2H_2O$) 0.1 กรัม ปรับค่า pH เป็น 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนโดยแปรผัน สารสกัดจากยีสต์ 0.295 กรัม/ลิตร เป็น peptone 0.208 กรัม/ลิตร หรือ yeast extract 0.1 กรัม/ลิตรและ peptone 0.138 กรัม/ลิตร หรือ yeast extract 0.148 กรัม/ลิตร และ peptone 0.105 กรัม/ลิตร กำหนดให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเหลวผลิตน้ำมันเป็น 1:1,664

3.4.3 ผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 โดยใช้อาหารเหลวผลิตน้ำมันที่ประกอบด้วยไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง 1000 มิลลิลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัม เพปโตน (peptone) 0.138 กรัม ปรับ pH 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนโดยแปรผัน สารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัม/ลิตร และ peptone 0.138 กรัม/ลิตร เป็น สารสกัดจากยีสต์ 0.295 กรัม/ลิตร หรือ peptone 0.208 กรัม/ลิตร หรือ สารสกัดจากยีสต์ 0.148 กรัม/ลิตร และ peptone 0.105 กรัม/ลิตร กำหนดให้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเหลวผลิตน้ำมันเป็น 1:1,664

3.5 การสกัดน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

นำเซลล์ยีสต์ที่แห้งแบบแช่เยือกแข็ง 0.1 กรัม มาใส่ในหลอดฝาเกลียว ใส่ chloroform : methanol (อัตราส่วน 2:1 v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปั่นผสม 15 วินาที ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (f = 37 kHz) นาน 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 g นาน 10 นาที นำส่วนใสมาเติม 0.73% NaCl น้ำหนัก/ปริมาตร ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ปั่นผสม 15 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,000 g นาน 10 นาที เก็บสารละลายใสชั้นล่าง มาใส่ในหลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง ชั่งหาน้ำหนักน้ำมันที่ได้

3.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

วิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ด้วยวิธี Gas-Chromatography ที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 การคำนวณหาปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมัน

$$\text{ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ (\% กรัมต่อกรัม)} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่ใช้สกัดน้ำมัน(กรัม)}} \times 100$$

$$\text{ผลผลิตน้ำมัน (กรัมต่อลิตร))} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่ใช้สกัดน้ำมัน(กรัม)}} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด (กรัม/ลิตร)}$$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

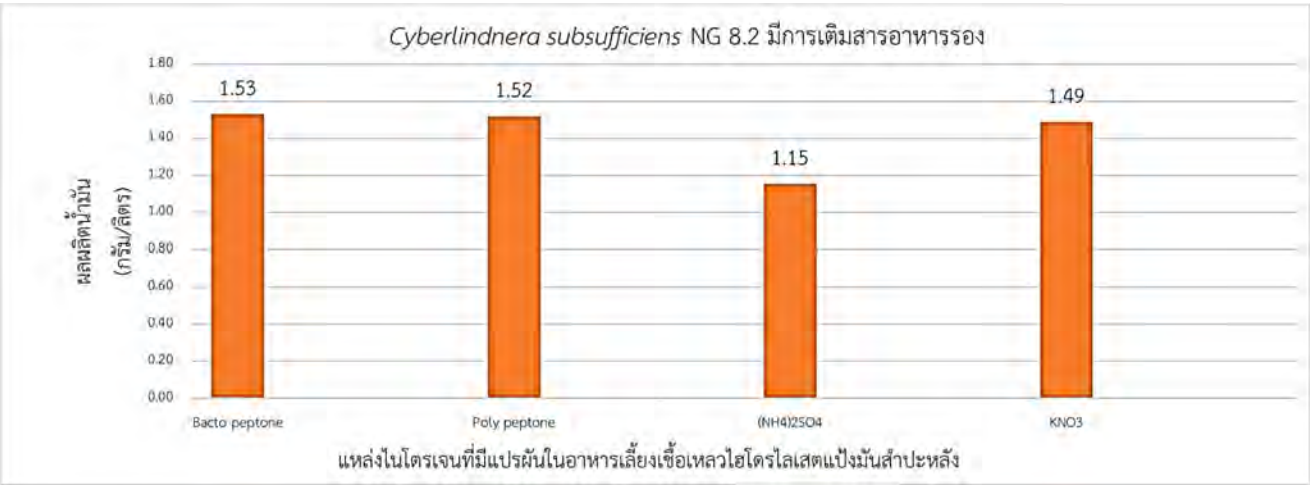
4.1 ผลการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง

4.1.1 ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมัน ไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัม/ลิตร peptone 0.138 กรัม/ลิตร $Mg_2SO_4•7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร NaCl 0.1 กรัม/ลิตร $CaCl_2•2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร แต่แปรผัน peptone เป็น polypeptone หรือ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 หรือ KNO_3 โดยกำหนดอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเหลวผลิตน้ำมันเป็น 1:1,664 พบว่าการแปรผันจาก peptone เป็น polypeptone ไม่มีผลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในขณะที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 มีปริมาณน้ำมันในเซลล์สูงสุด 13.34% กรัม/กรัม และผลผลิตน้ำมันสูงสุด 1.53 กรัม/ลิตร เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัม/ลิตร ร่วมกับ peptone (polypeptone) เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น (ตารางที่ 1) (ภาพที่ 9 และ 10)

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ , peptone และสารอาหารรอง แต่แปรผัน peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนอื่น

อาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนอื่น	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ % (กรัม/กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)
CSH + Yeast extract + Bacto peptone	13.20 ± 0.05	11.50 ± 0.28	1.53 ± 0.04
CSH + Yeast extract + Poly peptone	13.34 ± 0.73	11.49 ± 0.24	1.52 ± 0.11
CSH + Yeast extract + $(NH_4)_2SO_4$	10.22 ± 1.04	11.32 ± 0.22	1.15 ± 0.15
CSH + Yeast extract + KNO_3	12.19 ± 1.13	12.13 ± 0.14	1.49 ± 0.15

ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์, peptone และสารอาหารรอง แต่แปรผัน peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนอื่น

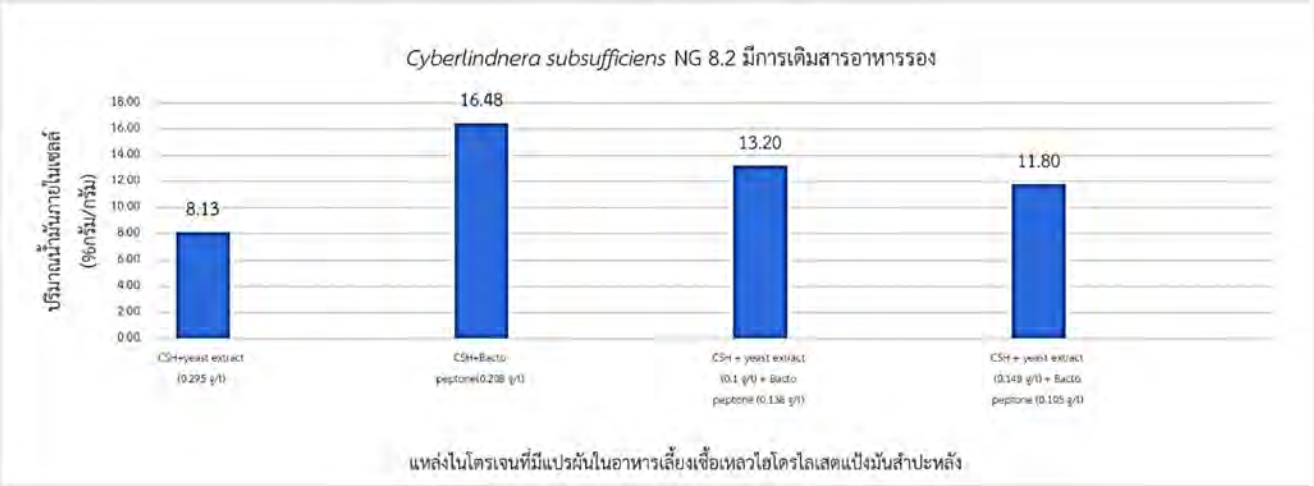


ภาพที่ 10 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์, peptone และสารอาหารรอง แต่แปรผัน peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนอื่น

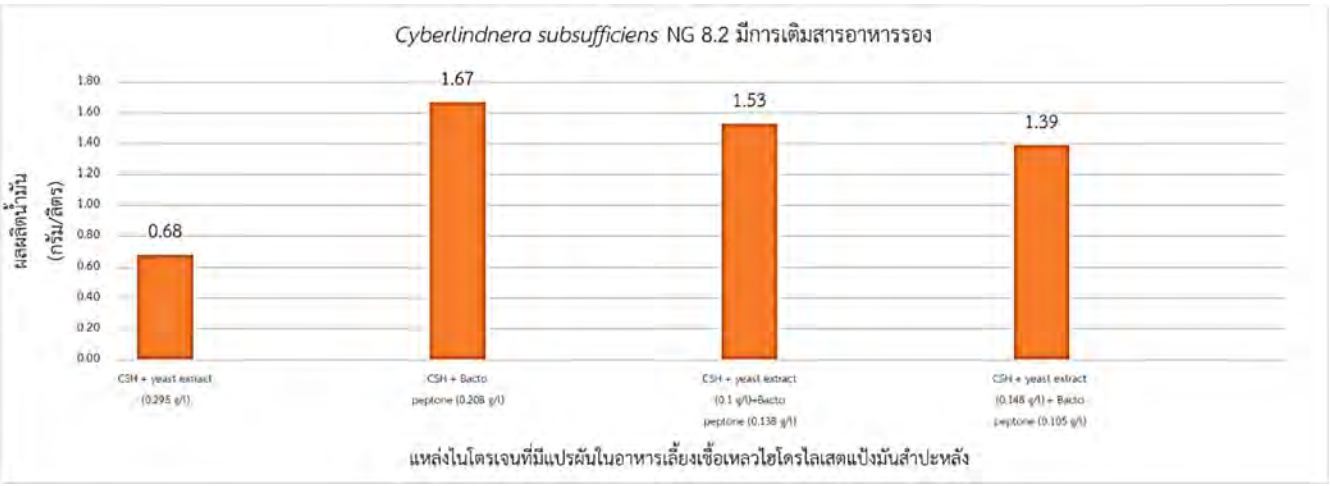
4.1.2 ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.295 กรัม/ลิตร $Mg_2SO_4•7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร NaCl 0.1 กรัม/ลิตร $CaCl_2•2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่นคือ peptone หรือ สารสกัดจากยีสต์ และ peptone โดยกำหนดอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเหลวผลิตน้ำมันเป็น 1:1,664 พบว่าในอาหารเหลวผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่มีการเติมสารอาหารรอง เมื่อแปรผันสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ผลิตน้ำมันใน peptone (1.67 กรัม/ลิตร) ได้มากกว่าใน peptone และสารสกัดจากยีสต์ หรือ สารสกัดจากยีสต์ เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 11 และ 12)

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำมันในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ และสารอาหารรอง แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น

อาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่แปรผันสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ % (กรัม/กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)
CSH + yeast extract (0.295 g/l)	8.13 ± 2.66	8.36 ± 0.27	0.68 ± 0.21
CSH + Bacto peptone (0.208 g/l)	16.48 ± 1.88	10.65 ± 0.24	1.67 ± 0.06
CSH + yeast extract (0.1 g/l) + Bacto peptone (0.138 g/l)	13.20 ± 0.85	11.5 ± 0.30	1.53 ± 0.04
CSH + yeast extract (0.148 g/l) + Bacto peptone (0.105 g/l)	11.80 ± 0.61	11.78 ± 0.27	1.39 ± 0.04



ภาพที่ 11 ปริมาณน้ำมันในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ และสารอาหารรอง แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น



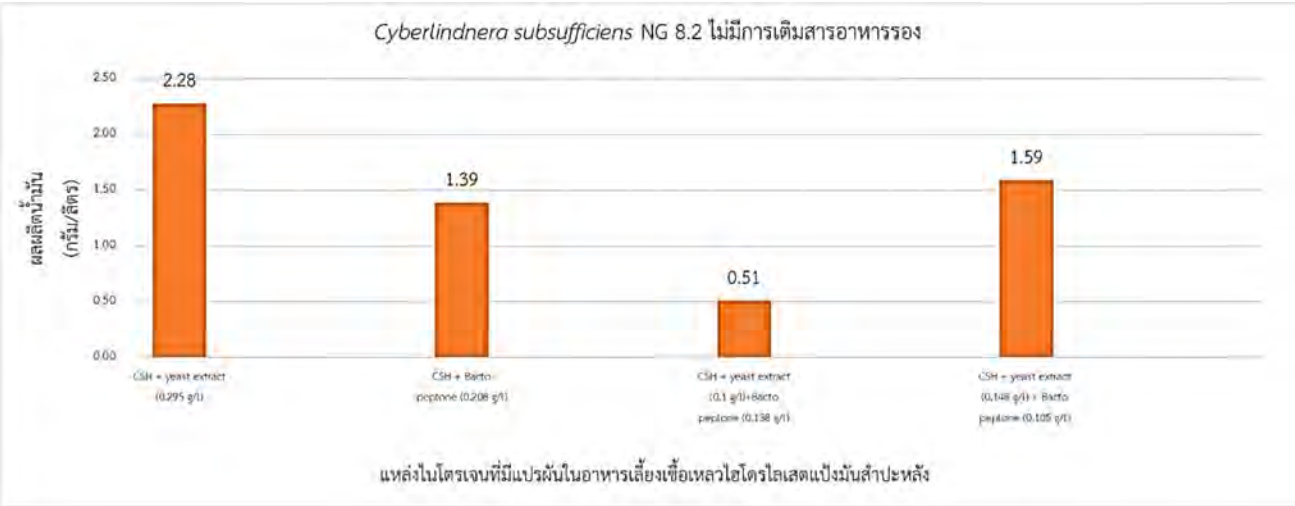
ภาพที่ 12 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ และสารอาหารรอง แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น

4.1.3 ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่มีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เป็นสารสกัดจากยีสต์ และ peptone ไม่เติมสารอาหารรอง แต่แปรผันแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เป็นสารสกัดจากยีสต์ หรือ peptone เพียงอย่างเดียว หรือแปรผันสัดส่วนระหว่างสารสกัดจากยีสต์ และ peptone โดยกำหนดอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเหลวผลิตน้ำมันเป็น 1:1,664 พบว่า *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 มีปริมาณน้ำมันในเซลล์สูงสุด (16.72% กรัม/กรัม) และให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด 2.28 กรัม/ลิตร เมื่อมีสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เพียงอย่างเดียว การใช้ peptone ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ หรือ peptone เพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทำให้ได้ผลผลิตน้ำมันลดลง (ตารางที่ 3) (ภาพที่ 13 และ 14)

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำมันในเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น

อาหารผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่แปรผันสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น ไม่มีสารอาหารรอง	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ % (กรัม/กรัม)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)
CSH + yeast extract (0.295 g/l)	16.72 ± 0.41	13.74 ± 0.20	2.28 ± 0.07
CSH + Bacto peptone (0.208 g/l)	11.04 ± 2.16	12.70 ± 0.16	1.39 ± 0.26
CSH + yeast extract (0.1 g/l) + Bacto peptone (0.138 g/l)	5.96 ± 1.11	8.71 ± 0.58	0.51 ± 0.12
CSH + yeast extract (0.148 g/l) + Bacto peptone (0.105 g/l)	11.27 ± 0.90	13.70 ± 0.76	1.59 ± 0.09

ภาพที่ 13 ปริมาณน้ำมันในเซลล์ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น



ภาพที่ 14 ผลผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่แปรผันสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น

4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารอาหารรอง แหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัม/ลิตร และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม/ลิตร พบว่ามี oleic acid (C 18:1) 34.64 % , palmitic acid (C 16:0) 26.32 % และ palmitoleic acid (C 16:1) 22.25 % เป็นกรดไขมันหลัก (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

กรดไขมัน	% ของกรดไขมันทั้งหมด
Myristic acid (C14:0)	0.52 ± 0.00
Palmitic acid (C16:0)	26.32 ± 0.02
Palmitoleic acid (C16:1)	22.25 ± 0.14
Stearic acid (C18:0)	0.69 ± 0.06
Oleic acid (C18:1)	34.64 ± 0.06
Linoleic acid (C18:2)	12.21 ± 0.02

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารเหลวผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่กำหนดอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 1,664 เท่ากับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารสังเคราะห์ผลิตไขมัน (Galafassi et al.,2012) พบว่าในสภาวะที่มีสารอาหารรองคือ $MgSO_4$, NaCl และ $CaCl_2$ การปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วยสารสกัดจากยีสต์ และ peptone ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด 1.53 กรัม/ลิตร สูงกว่าการปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วยสารสกัดจากยีสต์ และ $(NH_4)_2SO_4$ หรือสารสกัดจากยีสต์ และ KNO_3 นอกจากนั้นยังพบว่าการแทนที่ peptone ด้วย polypeptone ไม่มีผลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ในสภาวะที่มีสารอาหารรองคือ $MgSO_4$, NaCl และ $CaCl_2$ การปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วย peptone เพียงอย่างเดียว ทำให้ได้ผลผลิตน้ำมันสูงกว่าการปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วยสารสกัดจากยีสต์ และ peptone หรือ สารสกัดจากยีสต์ เพียงอย่างเดียว นอกจากนั้นยังพบว่าอัตราส่วนของ สารสกัดจากยีสต์ ต่อ peptone ที่ใช้ปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน มีผลต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ด้วย

ในสภาวะที่ไม่เติมสารอาหารรอง การปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วยสารสกัดจากยีสต์เพียงอย่างเดียว ให้ผลผลิตน้ำมันสูงกว่าการปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วย peptone หรือ สารสกัดจากยีสต์ และ peptone โดยการปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วย สารสกัดจากยีสต์ 0.295 กรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 มีปริมาณน้ำมันในเซลล์สูงสุด 16.72 % กรัม/กรัม และผลผลิตน้ำมันสูงสุด 2.28 กรัม/ลิตร ที่สภาวะนี้หากใช้ สารสกัดจากยีสต์ และ peptone ในการปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนพบว่า อัตราส่วนของ สารสกัดจากยีสต์ ต่อ peptone ที่ใช้มีผลต่อผลผลิตน้ำมันเช่นเดียวกัน

การผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลัง ไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารรอง ($MgSO_4$, NaCl และ $CaCl_2$) การปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วยไนโตรเจนอินทรีย์ให้ผลผลิตน้ำมันสูงกว่าไนโตรเจนอนินทรีย์ ($(NH_4)_2SO_4$ หรือ KNO_3) และไนโตรเจนอินทรีย์ที่ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุดจากผลการทดลองนี้คือ สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Bruno (2019) และ Sofia และคณะ (2016)

องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ที่ผลิตจากอาหารเหลวผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังที่เติมสารอาหารรอง ปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 1:1,664 ด้วย สารสกัดจากยีสต์ และ $(NH_4)_2SO_4$ มี oleic acid, palmitic acid และ palmitoleic acid เป็นกรดไขมันหลัก โดยมี palmitoleic acid 22.25 % ของกรดไขมันทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

Axelsson M, Gentili F. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. PLOS ONE. 2014: 24: 9(2).

Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, Franzosi, Bianchi D, Compagno C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. Bioresour Technol. 2012: 111: 398-403.

Kitcha S, Cheirsilp B. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. Energy Procedia. 2011: 274-282.

Landry F CC, Huang Z, Leclair G, Li CS, Oballa R, Zhang L, Bateman K. Plasma-based approach to measure target engagement for liver-targeting stearoyl-CoA desaturase 1 inhibitors. Journal of Lipid Resserch. 2011: 52(8): 1494-1499

Luis A, Garay, Kyria L, Bruce J. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: A Mechanistic Approach and Future Perspectives. J Agric Food Chem. 2014: 62(13): 2709–2727.

Passos ME, Alves HH, Momesso CM, Faria FG, Murata G, Cury-Boaventura MF, Hatanaka E, Massao-Hirabara S, Gorjão R. Differential effects of palmitoleic acid on human lymphocyte proliferation and function. Lipids Health Dis. 2016: 15(1): 217.

Pranimit R. Isolation of yeast for oil production from sugarcane leaves hydrolysate. Master's Thesis, Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University. 2017

Pranimit R, Hoondee P, Tanasupawat S, Savarajara A. Hydrolysate from Phosphate Supplemented Sugarcane Leaves for Enhanced Oil Accumulation in *Candida* sp. NG17. *BioResources* 2019: 14(1): 1014-1032.

Qin L, Liu L, Zeng A.P, Wei D. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. Bioresour Technol. 2017: 245: 1507-1519.

Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Shima J. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. Biotech. 2014: 153: 230-235.

Wang Y ZS, Zhu Z, Shen H, Lin X, Jin X, Jiao X, Zhao ZK. Systems analysis of phosphatelimitation-induced lipid accumulation by the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides. Biotechnol Biofuels. 2018: 11: 148.

Bruno Vasconcelos, José Carlos Teixeira, Giuliano Dragone & José António Teixeira. Oleaginous yeasts for sustainable lipid production from biodiesel to surf boards, a wide range of “green” applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 2019: 103: 3651–3667.

Sofia Maina, Chrysanthi Pateraki, Nikolaos Kopsahelis, Spiros Paramithiotis, Eleftherios H. Drosinos, Seraphim Papanikolaou, Apostolis Koutinas. Microbial oil production from various carbon sources by newly isolated oleaginous yeasts. Engineering in Life Sciences. 2016: 333-344.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast Malt extract medium (YM broth)

glucose 10 กรัม/ลิตร

yeast extract 3 กรัม/ลิตร

malt extract 3 กรัม/ลิตร

peptone 5 กรัม/ลิตร

pH 5.5

Yeast Malt extract medium (YM agar)

glucose 10 กรัม/ลิตร

yeast extract 3 กรัม/ลิตร

malt extract 3 กรัม/ลิตร

peptone 5 กรัม/ลิตร

agar 20 กรัม/ลิตร

pH 5.5

อาหารเหลวผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังซึ่งแปรผันแหล่งไนโตรเจน

1. yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร

   peptone 0.138 กรัม/ลิตร

   $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

   NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

   $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

   ใน Cassava starch hydrolysate

   pH 5.5

2. yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร

   polypeptone 0.162 กรัม/ลิตร

   $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

   NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

   $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

   ใน Cassava starch hydrolysate

   pH 5.5

3. yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร

   $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม/ลิตร

   $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

   NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

ใน Cassava starch hydrolysate

pH 5.5

4. yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร

KNO_3 0.154 กรัม/ลิตร

$Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

ใน Cassava starch hydrolysate

pH 5.5

5. yeast extract 0.295 กรัม/ลิตร

$Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

ใน Cassava starch hydrolysate

pH 5.5

6. peptone 0.208 กรัม/ลิตร

   $Mg_2SO_4 \bullet 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

   NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

   $CaCl_2 \bullet 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

   ใน Cassava starch hydrolysate

   pH 5.5

7. yeast extract 0.148 กรัม/ลิตร

   peptone 0.105 กรัม/ลิตร

   $Mg_2SO_4 \bullet 7H_2O$ 0.5 กรัม/ลิตร

   NaCl 0.1 กรัม/ลิตร

   $CaCl_2 \bullet 2H_2O$ 0.1 กรัม/ลิตร

   ใน Cassava starch hydrolysate

   pH 5.5

อาหารเหลวผลิตน้ำมันไฮโดรไลเสตแป้งมันสำปะหลังซึ่งแปรผันแหล่งไนโตรเจนที่ไม่มีการเติมสารอาหารรอง

1. yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร

   peptone 0.138 กรัม/ลิตร

   ใน Cassava starch hydrolysate

   pH 5.5

2. yeast extract 0.295 กรัม/ลิตร
   ใน Cassava starch hydrolysate

   pH 5.5

3. peptone 0.208 กรัม/ลิตร
   ใน Cassava starch hydrolysate

   pH 5.5

4. yeast extract 0.148 กรัม/ลิตร

   peptone 0.105 กรัม/ลิตร

   ใน Cassava starch hydrolysate

   pH 5.5