โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ศักยภาพของกลีเซอรอลและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันต่อการเป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ชื่อนิสิต นายธาตรี ภู่สาย **เลขประจำตัว** 5832339223

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงงาน	ศักยภาพของกลีเซอรอลและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันต่อการเป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2
โดย	นายธาตรี ภู่สาย รหัสนิสิต 5832339223
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

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

คณะกรรมการสอบโครงงาน

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

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

ชื่อโครงการ	ศักยภาพของกลีเซอรอลและกากเมล็ดน้ำมันปาล์มต่อการเป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2
ชื่อนิสิตผู้นำเสนอโครงการ	นายธาตรี ภู่สาย
เลขประจำตัวนิสิต	5632008323
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชร
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2 สามารถผลิตและสะสมน้ำมันเมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันคาร์บอนสูงไนโตรเจนต่ำที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน (1.85 กรัมต่อลิตร) มากกว่าอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (0.37กรัมต่อลิตร) ที่ 6 วัน กากเมล็ดปาล์มน้ำมันสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ได้ ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน (0.1 กรัมต่อลิตร) และแอมโมเนียมซัลเฟต (0.1 กรัมต่อลิตร) ได้ผลผลิตน้ำมัน 1.75 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมันสะสมภายในเซลล์ 13.69 % (กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) หากไม่เติมกากเมล็ดปาล์มน้ำมัน ผลผลิตน้ำมันจะลดลงเป็น 1.3 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ : กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน, แอมโมเนียมซัลเฟต, ยีสต์ผลิตน้ำมัน

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Project title: Potential of glycerol and palm kernel waste as raw material for lipid production of *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

Investigator: Mr. Thathee Poosai ID 583 23392 23

Project advisor: Prof. Ancharida Svarachorn, Ph.D.

Abstract

Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2 produced oil in high carbon but low nitrogen medium. Oil production medium containing glycerol as carbon source gave higher oil yeild (1.89 g/L) higher glucose (0.37 g/L) at 6 days. Palm kernel waste (PK) could served as inorganic nitrogen source for the oil production. The *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 gave maximum oil yield (1.75 g/L) and oil content (13.69 % w/w, dry cell weight) when grown in the oil production medium containing glycerol as a carbon source, PK (0.1 g/L), and ammonium sulfate (0.1 g/L) as organic and inorganic nitrogen sources, respectively. Without the PK supplement, the oil yield decreased to 1.3 g/L.

Keyword : palm kernel waste, ammonium sulfate, oleaginous yeast

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิตของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาประจำโครงการ

กราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาช่วยเหลือและ ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการทำการวิจัย และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่มอบความรู้ และข้อคิดต่างๆตลอดระยะเวลาการศึกษา

กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยให้การอบรมสั่งสอน คำแนะนำ ให้ความรัก ความห่วงใย และเป็น กำลังใจ ตลอดจนให้การสนับสนุนในเรื่องของการศึกษาตลอดมา

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนในด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการศึกษา

ขอขอบพระคุณพี่ๆ นิสิตปริญญาโทและปริญญาเอกห้อง 1804/15 ทุกท่านที่คอยให้คำแนะนำและชี้แนะการแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาของการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ภาคจุลชีววิทยารุ่นที่ 42 ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจกันและกันตลอดมา

ขอขอบคุณ ทุนเพิ่มศักยภาพส่วนงานในด้านการวจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ท้ายที่สุดนี้ ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความรู้และประสบการณ์อันมีค่า ตลอดระยะเวลาของการศึกษาที่ผ่านมา

นายธาตรี ภู่สาย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ(ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ)	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญแผนภาพ	ช
บทที่1 บทนำ	1
บทที่ 2 เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์	10
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	15
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	19
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก	23
ภาคผนวก ก.	24
ภาคผนวก ข.	28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	คุณสมบัติโดยทั่วไปของไลโปโปรตีนแต่ละชนิด	4
4.1	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ และผลผลิตน้ำมันเมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันที่แตกต่างกัน	15
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้ ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน	17
4.3	องค์ประกอบของกรดไขมันคิดเป็นเปอร์เซ็นของน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ผลิตและสะสมทั้งหมดภายในเซลล์	26

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ **หน้าที่**

ภาพที่1 โครสร้างของอณูไลโปโปรตีน (Ahnström, 2009) 2

ภาพที่2 การสะสมของไขมันและการเกิด foam-cell ภายในผนังหลอดเลือด (Ross, 1999) 5

ภาพที่3 วิถีชีวสังเคราะห์ไขมันภายในเซลล์ (Patel, Arora, Sartaj, Pruthi, & Pruthi, 2016) 8

ภาพที่4 แผนภูมิ 4.1 ผลผลิตน้ำมันสุทธิของยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 (กรัมต่อลิตร) 16

ภาพที่5 แผนภูมิ 4.2 ผลผลิตน้ำมันสุทธิของยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 (กรัมต่อลิตร) ในอาหารผลิตน้ำมันที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน 17

บทที่ 1

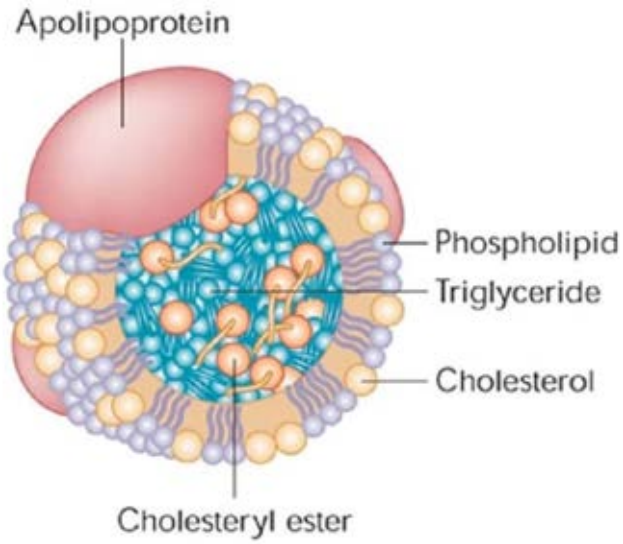
บทนำ

ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ภาวะหลอดเลือดแดงตีบตันหรือหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) หรือที่ถูกเรียกว่าโรคหลอดเลือดนั้น เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคต่างๆอีกมากมาย เช่นโรคหัวใจขาดเลือด, โรคหลอดเลือดสมองตีบหรือโรคหลอดเลือดแดงส่วนปลายอุดตัน (PAD) เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้หากมีอาการรุนแรงจะมีโอกาสนำไปสู่การเสียชีวิตได้ในที่สุด โดยในปี 2010 ที่ประเทศอังกฤษพบว่ามีผู้ป่วยและเสียชีวิตโดยมีสาเหตุมาจากโรคหลอดเลือดอยู่ที่ 6 เปอร์เซ็น จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดซึ่งเป็นเพศชายที่มีอายุอยู่ระหว่าง 35 ปี ถึง 39 ปี (Herrington, Lacey, Sherliker, Armitage, & Lewington, 2016) ปัจจุบันประเทศไทยมีคนไทยที่เป็นผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับโรคหัวใจและหลอดเลือดสูงเพิ่มมากขึ้นในทุกๆปี โดยสถิติจากกระทรวงสาธารณสุขเผยให้เห็นว่า ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 ถึง ปี พ.ศ. 2559 พบอัตราการตายของผู้ป่วยจากโรคหัวใจและหลอดเลือดต่อประชากร 100,000 คน โดยในปี พ.ศ. 2555 มีอัตราการตายเท่ากับ 23.4% ในปีต่อๆมาเพิ่มขึ้นเป็น 26.9%, 27.8%, 29.9% จนในปี พ.ศ. 2559 อัตราการตายเพิ่มขึ้นอยู่ที่ 32.3%และในวันที่ 16 กันยายน พ.ศ. 2561 กระทรวงสาธารณสุขเผยให้เห็นถึงตัวเลขแล้วว่ามีคนไทยที่เป็นผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดสูงถึง 432,943 คน มีอัตราการตายอยู่ที่ 20,855 คนต่อปี หรือ 2 ชั่วโมงต่อคน ชี้ให้เห็นได้ว่าประเทศไทยมีผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากโรคหัวใจและหลอดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกๆปีและยังมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (กรมสุขภาพจิต 2562)

หลอดเลือดแดงนั้นเปรียบเสมือนท่อโดยภายในท่อดังกล่าวจะมีการไหลเวียนของระบบเลือดที่ประกอบไปด้วย พลาสมาซึ่งเป็นของเหลวที่อยู่ภายในระบบเลือดและเม็ดเลือดแดงที่ทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งออกซิเจน หากหลอดเลือดแดงที่เปรียบเสมือนท่อนั้นเกิดอาการตีบหรืออุดตันก็จะส่งผลให้ระบบเลือดเดินทางไปสู่อวัยวะต่างๆได้ไม่สะดวกทำให้อวัยวะต่างๆเหล่านั้นเกิดการขาดเลือดรวมถึงการขาดออกซิเจน หากเกิดขึ้นเป็นระยะเวลานานก็จะทำให้เกิดอันตรายต่ออวัยวะนั้นๆ โดยพลาสม่าเป็นของเหลวที่อยู่ในระบบเลือดมีองค์ประกอบต่างๆมากมายที่อยู่ภายในพลาสม่า แต่ถ้าหากในพลาสมามีพลาสมาโปรตีนชนิดไลโปโปรตีนหนาแน่นต่ำ (LDL) ที่จัดเป็นคอเลสเตอรอลไม่ดีก็จะเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงหลักๆที่ทำให้เกิดภาวะ atherosclerosis ได้ (Ross, 1999)

ไลโปโปรตีนทำหน้าที่ในการขนส่งไขมันไปยังอวัยวะต่างๆในร่างกายโดยจะมีการขนส่งผ่านทางระบบเลือด ไลโพโปรตีนส่วนใหญ่จะมีลักษณะโครงสร้างเป็นทรงกลม (sphere) มีการเรียงตัวเป็นแบบ monolayer โดยจะมีการหันส่วนที่เป็นผิว (surface) ซึ่งมีโมลกุลที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด, อะลิโพไลโปโปรตีน, คลอเรสเตอรอล ซึ่งมีความสามรถในการละลายในตัวทำละลายที่เป็นโมเลกุลมีขั้ว และในตัวทำละลายที่เป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว (amphipathic molecule) หันออกไปด้านนอก ส่วนด้านใน (core) จะประกอบไปด้วย choresteryl ester และ triglyceride ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) การจัดเรียงโมเลกุลของโปรตีนและไขมัน ขึ้นเปนอณูไลโปโปรตีนจึงเปนวิธีการที่รางกายใชในการขนสง triglyceride ซึ่งเปน hydrophobic molecule ไปตามกระแสเลือดสู่อวัยวะต่างๆในร่างกาย



ภาพที่ 1 โครสร้างของอณูไลโปโปรตีน (Ahnström, 2009)

ไลโปโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นนั้นจำแนกได้หลายชนิดตามความแตกต่างในเรื่องของขนาด, ความหนาแน่น, การเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า, ชนิดและสัดส่วนของไขมันและโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของอณูไลโปโปรตีน การจำแนกอณูไลโพโปรตีนสามารถจำแนกออกได้เป็นกลุ่มตามความหนาแน่น โดยอาศัยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง (ultracentrifuge) ทำให้สามารถแยกไลโปโปรตีนออกได้เป็น 4 ชนิดได้แก่ chylomicron, ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำมาก (very low density lipoprotein (VLDL)), ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein (LDL)), และไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein (HDL))

นอกจากนี้หากแยกตามคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า ก็จะแยกได้ดังนี้ chylomicron, alpha lipoprotein (ได้แก่ HDL), beta lipoprotein (ได้แก่ LDL) และ pre-beta lipoprotein (ได้แก่ VLVD) โดยไลโปโปรตีนแต่ละชนิดก็จะมีขนาด, ความหนาแน่น, ปริมาณสัดส่วนของไขมัน, ปริมาณสัดส่วนของโปรตีนและหน้าที่แตกต่างกันออกไป โดยที่ปริมาณและสัดสวนของ triglyceride ในอณูของไลโปโปรตีน จะมีความสัมพันธกับความหนาแนน และ ขนาดของไลโปโปรตีน เนื่องจาก หากปริมาณ triglyceride ในอณูของไลโปโปรตีนที่สูงขึ้น จะสงผลทำใหสวน core ของไลโปโปรตีนใหญขึ้น ขนาดของอณูไลโปโปรตีนจึงเพิ่มขึ้นตามไปดวยเช่นกัน นอกจากนี้ไลโปโปรตีนขนาดใหญ ซึ่งมีปริมาณ triglyceride สูง จะมีปริมาณไขมันในสัดสวนมากกวาโปรตีนจึงทำใหไลโปโปรตีนนี้มีความหนาแนนต่ำ ในทางกลับกันไลโปโปรตีนที่มีปริมาณ triglyceride ต่ำอณูไลโปรตีนจะมีขนาดเล็กและมีสัดสวนของ ไขมันตอโปรตีนต่ำ ไลโปโปรตีนกลุมนี้จึงมีความหนาแนนสูง ดวยเหตุนี้ chylomicron จึงมีปริมาณ triglyceride สูงที่สุด และมีขนาดใหญที่สุด ตามมาดวย VLDL และ LDL ตามลำดับ (โดยสัดสวนของ cholesterol จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ) HDL จะมีปริมาณ triglyceride ต่ำที่สุด, มีขนาดเล็กที่สุด และมีความหนาแนนสูงสุด

ตารางที่1 คุณสมบัติโดยทั่วไปของไลโปโปรตีนแต่ละชนิด

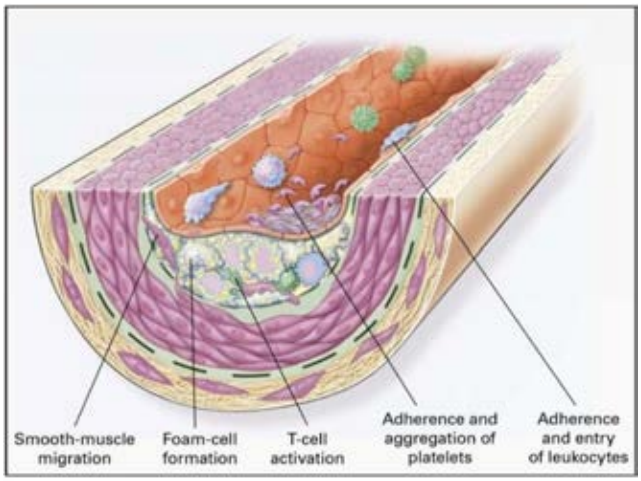
	Chylomicrons	VLDL	LDL	HDL
ความหนาแน่น (ก./มล.)	<0.94	0.94-1.006	1.006-1.063	1.063-1.21
ขนาด (นาโนเมตร)	80-1200	30-80	18-30	5-12
การเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า	origin	Pre-β-band	β-band	α-band
ปริมาณสัดส่วนของ (% โดยน้ำหนัก) ● ไขมันรวม ● Triglyceride ● Total cholesterol	 98 84 7	 89-96 44-60 16-22	 77 11 62	 50 3 19
ปริมาณสัดส่วนของโปรตีน (%โดยน้ำหนัก)	2	4-11	23	50
หน้าที่	ขนส่งไขมันที่ได้จากภายนอกร่างกายไปยังตับและเนื้อเยื่ออต่างๆภายในร่างกาย	ขนส่ง triglyceride ที่ได้จากภายในร่างกาย ไปยังเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกาย	ขนส่ง cholesterol ไปให้กับเซลล์หรืออวัยวะต่างๆที่มี LDL receptor	-ขนส่ง cholesterol จากเซลล์หรืออวัยวะต่างๆเข้าสู่ตับ (reverse cholesterol transport path way)

ดัดแปลงจาก - Remaley AT, McNamara JR, Warnick GR. Lipids and lipoproteins. In: Bishop ML, Fody EP, Schoeff L, eds. Clinical chemistry principles, procedures, correlations. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 282-313.

- Dominiczak MH. Lipoproteins and lipid transport. In: Baynes JW, Dominiczak MH, eds. Medical biochemistry. 3rd ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2009: 219-236.

ปัญหาจากโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (cardiovascular disease, CVD) เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตของผู้ป่วยทั่วโลก โดยมีสาเหตุมาจากการตีบตันของหลอดเลือดแดง (atherosclerosis) ที่ทำหน้าที่นำเลือดไปเลี้ยงหัวใจ อันเนื่องมาจากระดับคอลเรสเตอรอลที่อยู่ภายในเลือดสูงเกิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอลเรสเตอรอลชนิด LDL ประกอบกับปัจจัยอื่นๆเพิ่มเติมเช่น การสูบบุหรี่, เบาหวานหรือความดันโลหิตสูง ทำให้ผนังหลอดเลือดแดงมีความสามารถที่ทำให้เกิดการไหลผ่านเข้าออกของสาร (permeability) เพิ่มมากขึ้น ทำให้ LDL สามารถเดินทางผ่านกระแสเลือด เข้าไปยังผนังหลอดเลือดแดงแล้วไปสะสมอยู่ชั้น intima โดย LDL ที่เข้าไปสะสมอยู่ใน intima จะถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระ ได้เป็น oxidized LDL โดย oxidized LDL จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทำให้ monocyte ที่อยู่ในกระแสเลือดเดินทางเข้ามายังบริเวณผนังหลอดเลือดแล้วเปลี่ยนสภาพเป็น macrophage จากนั้น macrophage จะนำ LDL ที่ถูกออกซิไดซ์และสะสมอยู่ในผนังหลอดเลือดเข้าสู่เซลลทาง scavenger receptor เนื่องจาก scavenger receptor ไม่มีกลไก feedback inhibition และเซลลทั่วไปไม่สามารถนำ oxidized LDL เขาสู่เซลลทาง LDL receptor ได สงผลใหเกิดการสะสมของไขมัน จำนวนมากภายในเซลล ซึ่งจะเรียก macrophage ที่มีไขมันสะสมอยู่ในเซลลในปริมาณมากนี้วา foam cell โดย foam cell ที่เกิดขึ้น ตลอดจนเซลลบุหลอดเลือดจะมีการหลั่ง cytokine และ inflammatory mediator ออกมาหลายชนิดจะออกฤทธิ์กระตุ้นใหเซลลกลามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือดเพิ่มจำนวนและสังเคราะหคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเกิดเปนโครงสราง cap ที่คลุมสวนที่เปนไขมันเอาไว พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นทำใหเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดและทำให้รูของหลอดเลือดตีบแคบลงในที่สุดทำให้การเดินทางของกระแสเลือดบริเวณนั้นเกิดขึ้นไม่สะดวก โดยจะเรียกสวนของหลอดเลือดที่มีการหนาตัวนี้วา atheroma หรือ atherosclerotic plaque (Ahnström, 2009) ผลของการตีบแคบของรูหลอดเลือดอาจมีผลให มีการขาดเลือดของเนื้อเยื่อที่ไดรับเลือดจากหลอดเลือดเสนนั้นๆ หากเกิดขึ้นบริเวณหลอดเลือดที่นำเลือดไปเลี้ยงหัวใจก็จะทำให้หัวใจนั้นขาดเลือดและนำไปสู่การเสียชีวิตได้

ภาพที่ 2 การสะสมของไขมันและการเกิด foam-cell ภายในผนังหลอดเลือด (Ross, 1999)



ต่อมามีนักวิทยาศาสตร์ค้นพบว่ากรดไขมันปามิโตเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่ 1 ตำแหน่งซึ่งอยู่ในกลุ่มของกรดไขมันโอเมก้า 7 นั้นมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนซึ่งถูกเรียกว่า lipokine มีผลต่อปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค metabolic syndrome เช่นการสะสมไขมันที่มากเกินไป กรดไขมันโอเมก้า 7 จะมีส่วนช่วยในการยับยั้งการสร้างไขมันในร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมันที่ส่งผลต่อการทำลายเนื้อเยื่อและไขมันที่ก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ในความเป็นจริงได้มีการนำกรดไขมันโอเมก้า 7 มาใช้เป็นยาให้ผู้ป่วยที่มีปริมาณคอเลสเตอรอลสูง เนื่องจากกรดไขมันโอเมก้า 7 มีความสามารถในการเพิ่ม HDL และลด LDL ในร่างกายทำให้สามารถช่วยลดปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคไขมันอุดตันในหลอดเลือด จากการศึกษาที่ Cleveland Clinic พบว่ากรดไขมันโอเมก้า 7 ส่งผลทำให้ปริมาณ HDL สูงขึ้นหลังจากที่ผู้ป่วยได้รับประทานยาไปแล้ว 8 ถึง 12 สัปดาห์และยังพบอีกว่าบริเวณที่มีการโป่งพองของผนังหลอดเลือดนั้นมีขนาดลดลงถึง 47% (Stockton 2014) อีกทั้งในปี 2014 ได้มีงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Clinical Lipidology โดยในงานวิจัยได้มีการทดลองให้ผู้ถูกทดลองทั้งที่เป็นเพศชายและเพศหญิงรวมทั้งหมด 60 คน มีอายุอยู่ระหว่าง 17 ถึง 70 ปี ที่เป็นโรคไขมันในเลือดสูง (dyslipidemia) จากนั้นทำการสุ่มให้ยาแก่ผู้ถูกทดลองโดยจะมีการให้ยาแบบสุ่ม ยาจะมีลักษณะเป็นแคปซูลโดยมีการบรรจุ cis-palmitoleic acid ซึ่งจัดเป็นกรดไขมันชนิด omega-7 ในปริมาณ 220.5 มิลลิกรัม กับยาแคปซูลที่ไม่ได้บรรจุ cis-palmitoleic acid (placebo) โดยมีการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ถูกทดลองก่อนรับประทานยา จากนั้นให้ผู้ถูกทดลองรับประทานยาเป็นเวลา 30 วัน จากนั้นพอครบ 30 วันก็ทำการเก็บตัวอย่างเลือด จากนั้นนำเลือดที่เก็บจากผู้ถูกทดลองหลังได้รับยาเปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดของผู้ถูกทดลองที่เก็บมาก่อนจะได้รับยาเพื่อดูปริมาณ HDL, LDL, triglyceride ผลปรากฏว่าผู้ถูกทดลองคนไหนที่ได้รับประทานยาแคปซูลที่มีการบรรจุ cis-palmitoleic acid มีปริมาณคลอเลสเตอรอลชนิด HDL เพิ่มขึ้น 5% คลอเลสเตอรอลชนิด LDL และไตรกลีเซอไรด์ลดลง 8% และ 15% ตามลำดับ จากผลการวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า palmitoleic acid มีความสำคัญในการควบคุมเมทาบอลิซึม เพื่อควบคุมปริมาณไขมันในร่างกาย (Bernstein, Roizen, & Martinez, 2014)

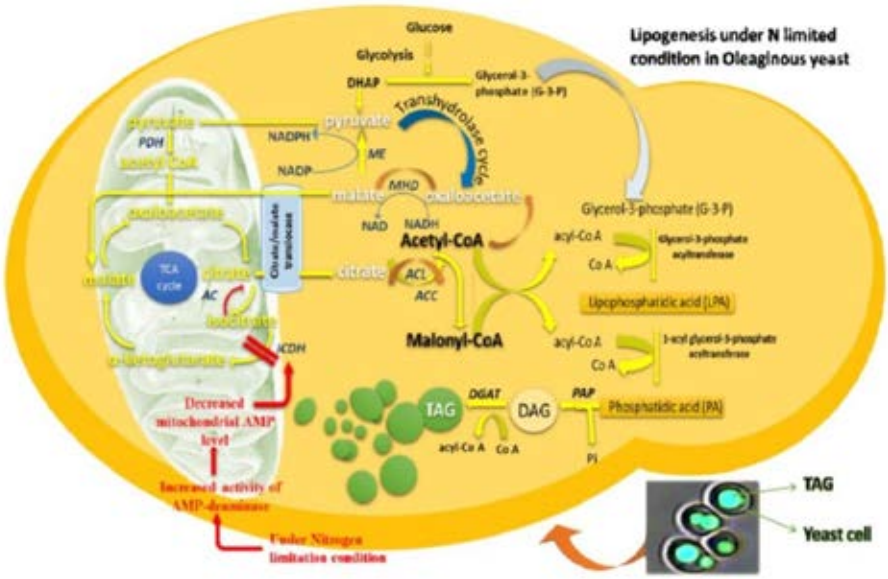
กรดไขมันปามิโตเลอิกนั้นสามารถพบได้ทั่วไปเช่น จากไขมันสัตว์แต่จะพบได้ในปริมาณน้อย นอกจากไขมันจากสัตว์แล้วแหล่งกรดไขมันปามิโตเลอิกสามารถพบได้จาก ผล sea buckthorn และเมล็ดถั่วแมคคาเดเมียจะมีกรดไขมันปามิโตเลอิกสะสมในปริมาณสูงโดยจะอยู่ที่ 40% และ 12-22 % ตามลำดับ แต่เนื่องจากแหล่งของกรดไขมันปามิโตเลอิกดังกล่าวนั้นมีอยู่จำกัด จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการหาแหล่งของกรดไขมันปามิโตเลอิกจากแหล่งอื่นต่อไป (Kolouchová, Sigler, Schreiberová, Masák, & Řezanka, 2015)

ต่อมาได้มีการศึกษาและพบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้เซลล์ยีสต์เป็นแหล่งในการผลิตกรดไขมันปามิโตเลอิกในปริมาณมาก โดยการเลี้ยงในสภาวะที่ทำให้เกิดการเจริญและกระตุ้นในเกิดการผลิตน้ำมันและให้ได้กรดไขมันที่ต้องการในปริมาณสูง (Dallé da Rosa et al., 2014) โดยการกำหนดองค์ประกอบของอาหารเช่น แหล่งคาร์บอนที่ใช้เลี้ยงและการจำกัดแหล่งไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัส พีเอชของอาหารรวมถึงอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยง เนื่องจากปัจจัยดังกล่าวนั้นมีผลต่อปริมาณของน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์รวมถึงองค์ประกอบของกรดไขมันจากการสร้างน้ำมันและสะสมภายในเซลล์ (Braunwald et al., 2013; Chen et al., 2013; Dallé da Rosa et al., 2014)

ยีสต์ผลิตน้ำมัน (oleaginous yeast) เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำมันและเก็บสะสมภายในเซลล์ให้อยู่ในรูปของหยดน้ำมันที่เรียกว่า single cell oil (SCO) ได้สูงถึง 20% ต่อน้ำหนักแห้ง ยกตัวอย่างเช่น *Lipomyces starkeyi, Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, หรือ*Yarrowia lipolytica* ซึ่งยีสต์เหล่านี้มีข้อดีในการใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันที่ดีกว่าการใช้พืชหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเป็นแหล่งผลิตน้ำมัน เนื่องจากใช้เวลาในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนน้อย ไม่ได้รับผลกระทบจากสภาพอากาศหรือฤดูการที่เปลี่ยนแปลง รวมถึงไม่เสียพื้นที่ในการเพาะปลูกเมื่อเทียบกับการใช้พืชเป็นแหล่งผลิตน้ำมัน และสามารถเพาะเลี้ยงรวมถึงการขยายกำลังการผลิตได้ง่ายกว่าหากเทียบกับการใช้สาหร่ายเซลล์เดียวเป็นแหล่งผลิตน้ำมัน และที่มากไปกว่านั้นองค์ประกอบของน้ำมันที่ได้ก็จะแตกต่างกันไปหากมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน ไขมันที่ได้จาก oleaginous yeast ก็จะมีประโยชน์ที่แตกต่างกันไป นิยมนำไปใช้ในหลากหลายอุตสาหกรรม (Ageitos, Vallejo, Veiga-Crespo, & Villa, 2011)

ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอและมีแหล่งไนโตรเจนจำกัดหรือมีอัตราส่วนระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนสูง oleaginous yeast จะเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นน้ำมันแล้วสะสมอยู่ในรูปไตรเอซีลกลีเซอรอล (triacylglycerol, TAG) จากนั้นจะเก็บสะสมไว้ใน vesicle ภายในเซลล์ โดยวิถีชีวสังเคราะห์ไขมันภายในเซลล์ของยีสต์ เมื่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส เข้าสู่เซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ที่บริเวณไซโทซอล (cytosol) จากนั้นจะถูกส่งไปยังไมโทคอนเดรียเกิดวัฏจักรเครบส์หรือ TCA cycle โดยไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็น acetyl CoA, citrate และisocitrate ตามลำดับ แต่เนื่องจากสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ adenosine monophosphate deaminase ให้เปลี่ยน adenosine monophosphate (AMP) เป็น inosine 5’-monophosphate และ ammonium ทำให้ AMP ในไมโทรคอนเดรียลดลง ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ไม่สามารถ

เปลี่ยน isocitrate ไปเป็น α-ketoglutarate ตามวัฏจักรเครบส์ได้ isocitrate จะถูกเปลี่ยนกลับมาเป็น citrate ด้วยเอนไซม์ aconitase ทำให้มีการสะสมของ citrate อยู่ภายในไมโทรคอนเดรียเป็นจำนวนมาก citrate จึงถูกส่งออกจากไมโทรคอนเดรียผ่าน citrate/malate translocase ไปยังไซโทซอลและถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate โดยเอนไซม์ ATP-citrate lyase (ACL) ต่อมา acetyl CoA ถูกเปลี่ยนเป็น malonyl CoA โดยเอนไซม์ acetyl CoA carboxylase acetyl CoA จากนั้น acetyl-CoA และ malonyl CoA ในยีสต์จะมีการฟอร์มโครงสร้างกับ glycerol-3-phosphate (G3P) หรือ lipophosphatidic acid ได้เป็น phosphatidic acid (PA) และ dihydroxyacetone phosphate (DHAP) ตามลำดับ ปริมาณของ glycerol-3-phosphate ขึ้นกับปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่อมา phosphatidic acid จะถูกเปลี่ยนเป็น diacylglycerol (DAG) โดยเอนไซม์ phosphatidate phosphatase ในกระบวนการ dephosphorylation และขั้นตอนสุดท้ายคือ การสังเคราะห์ไขมันหรือ lipogenesis ขั้นตอนนี้จะทำให้ยีสต์แต่ละชนิดสังเคราะห์กรดไขมันที่มีโครงสร้างแตกต่างกันโดยการจับกันเองระหว่าง acetyl CoA และ diacylglycerol ด้วยเอนไซม์ diacylglycerol acyltransferase (DGAT) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือไตรเอซีลกลีเซอรอลสะสมภายในเซลล์เรียกวิถีการสังเคราะห์นี้ว่า Kenedy pathway (Patel et al., 2016)



ภาพที่ 3 วิถีชีวสังเคราะห์ไขมันภายในเซลล์ (Patel et al., 2016)

oleaginous yeast สามารถที่เจริญและผลิตน้ำมันภายในเซลล์ โดยใช้แหล่งอาหารที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น ใช้แหล่งคาร์บอนจากกลีเซอรอลซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล กากเมล็ดปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นของเสียที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งไนโตรเจน (Leiva-Candia et al., 2014) ในปี 2559 ประเทศไทยมีผลผลิตปาล์มน้ำมันสูงถึง 11 ล้านตัน(สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2561) จึงมีปริมาณกากเมล็ดปาล์มน้ำมันในปริมาณมากที่ยังไม่มีการนำมาใช้อย่างคุ้มค่า จากความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลายของ oleaginous yeast ทำให้ oleaginous yeast มีศักยภาพสูงสำหรับการนำมาใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถลดต้นทุนในการผลิตจากการใช้ของเสียเป็นสารตั้งต้นเพื่อให้เซลล์ยีสต์เจริญและผลิตน้ำมันได้

Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2 เป็นหนึ่งใน oleaginous yeast ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ คัดแยกได้จากในดินจังหวัดระนองประเทศไทย พบว่ามีองค์ประกอบของกรดไขมันปามิโตเลอิกสูงถึง 22.25% ของปริมาณน้ำมันที่ผลิตและสะสมภายในเซลล์ (รัชนา 2560)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการนำกลีเซอรอลและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ สำหรับการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 และผลต่อปริมาณ palmitoleic acid ในน้ำมันที่ผลิต

บทที่2

เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์

อุปกรณ์ที่ใช้ทดลอง

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. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S-20K บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S-UV-VIS บริษัท Thermo Scientific Inc, USA
12. ตู้ดูดไอสารระเหยสารเคมี (fume Hood) บริษัท Flexlab, Thailand
13. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) บริษัท Lab service, Thailand
14. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
15. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Thailand

16. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 5000 ไมโครลิตร บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
17. อ่างส่งคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น Elma E30H บริษัท Tovatech, USA

เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: HCl) บริษัท Sigma Inc, Germany
2. กลูโคส (D-glucose: $C_6H_{12}O_6$) บริษัท Sigma lnc, Germany
3. คลอโรฟอร์ม (chloroform: $CHCl_3$) 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. เมทานอล (methanol: CH_3OH) บริษัท V.S. Chem house, Bangkok
8. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany
9. วุ้นผง (agar) บริษัท Becton, USA
10. สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท Becton, Dickinson & Company, USA
11. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Becton Co. Ltd, Germany
12. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate: $(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck Co. Ltd, Germany
13. กลีเซอรอล บริษัท Merck Co. Ltd, Germany
14. กากเมล็ดปาล์ม

เชื้อจุลินทรีย์

Cyberlindnera subsufficiens NG 8.2 คัดแยกได้จากในดินจังหวัดระนองประเทศไทย (รัชนา 2560)

บทที่3

วิธีการทดลอง

3.1. เปรียบเทียบการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์กับอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำซึ่งมีกลูโคสและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2

ย้ายโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM (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) ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชม. ลงในอาหารเหลว YM 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเป็น 0.8 เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิมนาน 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 9803 × g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.1.2 การเตรียมอาหารผลิตน้ำมัน (lipid production medium) ที่มีแหล่งคาร์บอนสูงและแหล่งไนโตรเจนต่ำ

3.1.2.1 การเตรียมอาหารผลิตน้ำมันซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ **(glucose – $(NH_4)_2SO_4$ – yeast extract medium)** โดยละลายกลูโคส 50 กรัม, yeast extract (YE) 0.1 กรัม, แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2\ SO_4$ 0.1 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \bullet 7H_2O$) 0.5 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \bullet H_2O$) 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 100 kPa เป็นเวลา 15 นาที

3.1.2.2 การเตรียมอาหารผลิตน้ำมันซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและกากเมล็ดปาล์มน้ำมัน (palm kernel waste, PK) เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (**glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium medium)** ทำโดยปรับสภาพกากเมล็ดปาล์มน้ำมัน 0.1 กรัมต่อลิตร ด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 100 kPa เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman นำส่วนของเหลวที่กรองได้ ไปใช้เตรียมอาหารผลิตน้ำมันต่อโดยการละลายกลีเซอรอล 48 มิลลิลิตร, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 0.1 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม ในปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 100 kPa เป็นเวลา 10 นาที

3.1.2.3 การเตรียมอาหารผลิตน้ำมันซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ **(glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium)** ทำโดยละลายกลีเซอรอล 48 มิลลิลิตร, yeast extract 0.1 กรัม, แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 0.1 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 100 kPa เป็นเวลา 15 นาที

3.1.3 การหาอาหารที่เหมาะสมเพื่อให้ยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตน้ำมันในปริมาณสูง

นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1 มาล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1988 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.2 ชนิดต่างๆ 10 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารผลิตน้ำมันชนิดเดียวกันกับที่แขวนลอยเซลล์อยู่ 40 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 6 วัน พอครบ 6 วัน นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ 9803 × g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปทำแห้งโดยวิธีเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ (lyophilization) แล้วนำไปสกัดน้ำมัน

3.1.4 การสกัดน้ำมันจากยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2

ชั่งเซลล์แห้งจากข้อ 3.1.3 ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติม chloroform : methanol (อัตราส่วน 2:1 v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (f = 37 kHz) นาน 15

นาที ดูดใส่ eppendorf ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนชั้นน้ำด้านบนใส่หลอดเทฟลอนใหม่ เติม NaCl (0.73% w/v) 1.6 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้เป็นสารผสม chloroform : methanol : water (อัตราส่วน 2:1:0.8 v/v/v) เขย่าผสมให้เข้ากัน 15 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 11104 × g 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นล่างใส่หลอดทดลองที่ทราบน้ำหนักแล้ว นำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ชั่งหาน้ำหนักน้ำมันที่ได้

3.1.4.1 การคำนวณหาปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และผลผลิตน้ำมัน

$$\text{ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ \%(กรัม/กรัม)} : \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์ที่ใช้ในการสกัด (กรัม)}} \times 100$$

$$\text{ผลผลิตน้ำมัน (กรัม/ลิตร)} : \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์ที่ใช้ในการสกัด}} \times \text{น้ำหนักเซลล์ทั้งหมด (ลิตร)}$$

3.2 การเปรียบเทียบการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน หรือ แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจน

3.2.1 เตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ตามวิธีข้อ 3.1.1

3.2.2 ผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ตามวิธีข้อ 3.1.1 ในอาหารผลิตน้ำมันที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแต่แปรผันแหล่งไนโตรเจนดังนี้ 1) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร 2) กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน 0.1 กรัมต่อลิตรร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร และ3) กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยที่อาหารทั้ง 3 ชนิด ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ตามวิธีข้อ 3.1.2.2

บทที่ 4

ผลการทดลอง

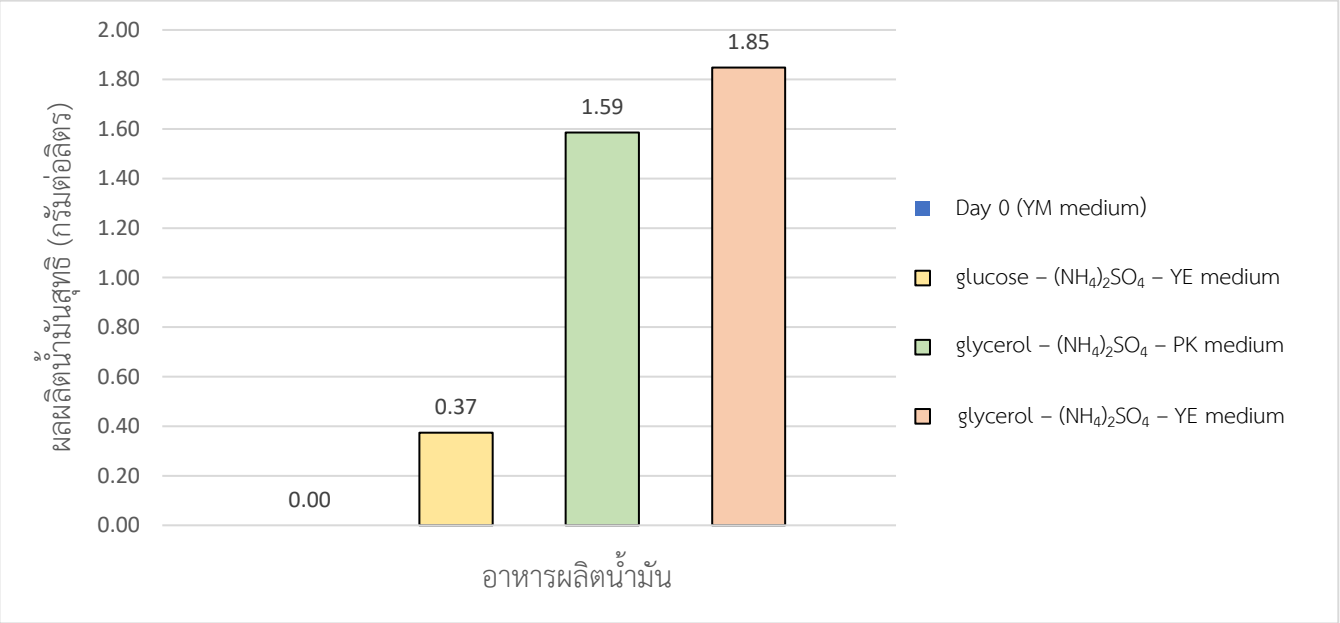
4.1. ผลการหาปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตและสะสมภายในเซลล์เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันที่แตกต่างกัน

ผลการเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ในอาหาร YM medium สำหรับการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นเวลา 2 วันและแขวนลอยเซลล์ที่ได้ 3.79 ± 0.10 กรัมต่อลิตรในอาหารผลิตน้ำมันชนิดต่างๆ เป็นเวลา 6 วัน พบว่าปริมาณน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ที่แขวนลอยในอาหารผลิตน้ำมัน 3 ชนิด ได้แก่ อาหารซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (glucose – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium) อาหารซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium) และอาหารซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและมีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium) เท่ากับร้อยละ 3.95 ± 1.00, 12.55 ± 2.47 และ14.85 ± 2.09 กรัม/กรัมโดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1 แผนภูมิที่ 4.1)

ตาราง 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ และผลผลิตน้ำมันเมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันที่แตกต่างกัน

	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ (%กรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)
Day 0 (YM medium)	3.79 ± 0.10	0.31 ± 0.26	0.00
glucose – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium	9.38 ± 0.60	3.95 ± 1.00	0.37
glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium	12.77 ± 2.14	12.55 ± 2.47	1.59
glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium	12.33 ± 1.35	14.85 ± 2.09	1.85

แผนภูมิ 4.1 ผลผลิตน้ำมันสุทธิของยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 (กรัมต่อลิตร)



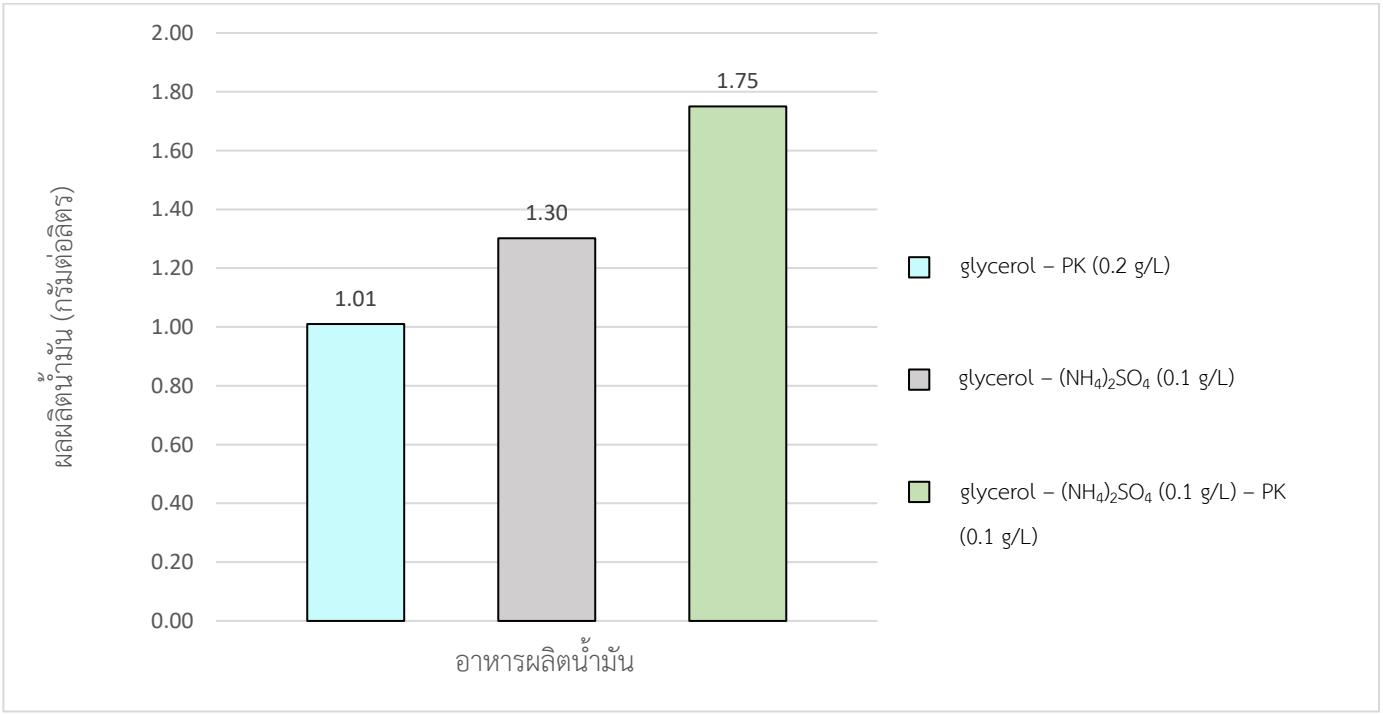
4.2. ผลการหาปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตและสะสมภายในเซลล์เมื่อเจริญในอาหารซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมซัลเฟตหรือกากเมล็ดปาล์มน้ำมันร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตหรือกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจน

ผลการเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันชนิดต่างๆซึ่งแปรผันแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 6 วัน พบว่าปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตและสะสมภายในเซลล์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแต่แปรผันแหล่งไนโตรเจนเป็น 1) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร 2) กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน 0.1 กรัมต่อลิตรร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร และ3) กากเมล็ดปาล์มน้ำมันเพียงอย่างเดียว 0.2 กรัมต่อลิตร เท่ากับร้อยละ 15.42 ± 1.07, 13.69 ± 0.11 และ 11.95 ± 1.23 กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ (ตารางที่ 4.2 แผนภูมิที่ 4.2) *ในอาหารทั้ง 3 ชนิดไม่เติมสารสกัดจากยีสต์

ตาราง 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ และผลผลิตน้ำมัน เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน

	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ (%กรัม/กรัมเซลล์แห้ง)	ผลผลิตน้ำมัน (กรัมต่อลิตร)
glycerol - $(NH_4)_2SO_4$ medium	8.36 ± 0.14	15.42 ± 1.07	1.30
glycerol - $(NH_4)_2SO_4$ - PK (0.1 g/L) medium	12.77 ± 2.14	13.69 ± 0.11	1.75
glycerol - PK (0.2 g/L) medium	8.47 ± 0.08	11.95 ± 1.23	1.01

แผนภูมิ 4.2 ผลผลิตน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตในอาหารผลิตน้ำมันที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน



4.3 ผลการหาองค์ประกอบของกรดไขมันในปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตและสะสมภายในเซลล์เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมัน 2 ชนิด ได้แก่อาหารซึ่งกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและมีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium) และอาหารซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium)

มีองค์ประกอบของ palmitoleic acid ในปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตและสะสมภายในเซลล์เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมันนอาหาร glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium และ glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium เท่ากับ 23.81% และ 22.31% ตามลำดับ

ตาราง 4.3 องค์ประกอบของกรดไขมันคิดเป็นเปอร์เซ็นของน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ผลิตและสะสมทั้งหมดภายในเซลล์

ชนิดของอาหารผลิตน้ำมัน / ชนิดของกรดไขมัน	glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium	glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium
C14:0 Myristic acid	0.66 ± 0.02	0.62 ± 0.03
C16:0 Palmitic acid	30.49 ± 1.87	31.07 ± 1.75
C16:1 Palmitoleic acid	23.81 ± 1.45	22.13 ± 1.05
C18:0 Stearic acid	1.34 ± 0.12	1.45 ± 0.13
C18:1 Oleic acid	29.98 ± 0.92	32.15 ± 0.55
C18:2 Linoleic acid	10.79 ± 0.31	10.11 ± 1.04

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ผลการศึกษาปริมาณน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตและสะสมภายในเซลล์เมื่อเจริญในอาหารผลิตน้ำมัน 3 ชนิด ได้แก่ อาหารซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (glucose – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium) อาหารซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK (PK;0.1 g/L) medium) และอาหารซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium) โดยอาหารผลิตน้ำมันทั้ง 3 ชนิดนี้มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เป็นเวลา 6 วัน พบว่ายีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ที่แขวนลอยในอาหาร **glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium** ให้ผลผลิตปริมาณน้ำมันสูงที่สุด 1.85 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์เท่ากับ 14.85% กรัม/กรัมเซลล์แห้ง รองลงมาคือในอาหาร **glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK (PK;0.1 g/L) medium** ได้ผลผลิตน้ำมัน 1.59 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมันสะสมในเซลล์ 12.55 % กรัม/กรัมเซลล์แห้ง อาจเป็นเพราะเซลล์สามารถนำกลีเซอรอลมาผลิตน้ำมันผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ที่รวดเร็วกว่ากลูโคส นอกจากนั้นยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ยังสามารถใช้กากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์แทนสารสกัดจากยีสต์ได้ แต่ทั้งนี้ยังสรุปไม่ได้ว่าสารสกัดจากยีสต์ให้ผลผลิตน้ำมันสูงกว่ากากเมล็ดปาล์มน้ำมัน เพราะปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ที่ใช้ไม่เท่ากัน

จากผลการทดลองต่อมาที่พบว่าในอาหารผลิตน้ำมันที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน (0.1 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และแอมโมเนียมซัลเฟต (0.1 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ หากไม่เติมกากเมล็ดปาล์มมีเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต (0.1 กรัมต่อลิตร) ผลผลิตน้ำมันจะลดลงจาก 1.75 เป็น 1.30 กรัมต่อลิตร การใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (0.1 กรัมต่อลิตร) ร่วมกับกากเมล็ดปาล์มน้ำมัน (0.1 กรัมต่อลิตร) ให้ผลผลิตน้ำมันสูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (0.1 กรัมต่อลิตร) เพียงอย่างเดียว อาจเป็นผลมาจากปริมาณไนโตรเจนที่มากกว่า หรือผลของการขาดไนโตรเจนอินทรีย์บางชนิดที่มีในกากเมล็ดปาล์มน้ำมัน แต่เมื่อใช้การเมล็ดปาล์ม (0.2กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ โดยไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต (0.1 กรัมต่อลิตร) ผลผลิตน้ำมันจะลดลงจาก 1.75 เป็น 1.01 กรัมต่อลิตร ในทำนองเดียวกันการใช้กากเมล็ดปาล์มน้ำมันเพียงอย่างเดียว (0.2 กรัมต่อลิตร) ทำให้ผลผลิตน้ำมันต่ำกว่าที่ได้จากการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (0.1 กรัมต่อลิตร) อาจเกิดจากปริมาณไนโตรเจนในกากเมล็ดปาล์มน้ำมัน (0.2 กรัมต่อลิตร) ต่ำกว่าหรือเป็นผลมาจากความต้องการของแอมโมเนียมในการสังเคราะห์น้ำมัน จึงควรกำหนดให้ทุกการทดลองที่ทำมีปริมาไนโตรเจน

เท่ากันเพื่อที่จะสรุปได้ว่ายีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ผลิตน้ำมันได้ดีเมื่อแขวนลอยในอาหารผลิตน้ำมันมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ หรือกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ หรือต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับกากเมล็ดปาล์มน้ำมัน

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันที่ยีสต์ผลิตและสะสมภายในเซลล์พบว่า ในอาหารผลิตน้ำมันซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ **(glucose – $(NH_4)_2SO_4$ – yeast extract medium)** พบว่าน้ำมันที่ยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตและสะสมภายในเซลล์ มีองค์ประกอบของกรดไขมันปามิโตเลอิกเท่ากับ 22.25% จากปริมาณน้ำมันที่ผลิตและสะสมทั้งหมดภายในเซลล์ (รัชนา 2560) ในอาหารผลิตน้ำมันซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ **(glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium)** พบว่าน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsuffiiciens* NG 8.2 ผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันปามิโตเลอิกเท่ากับ 22.13% ซึ่งใกล้เคียงกันมาก จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอลและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันมีศักยภาพพอที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแทนกลูโคสและสารสกัดจากยีสต์ซึ่งมีราคาแพงเป็นการลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

กรมสุขภาพจิต. (2562). *เผยสถิติน่าตกใจคนไทยป่วยโรคหัวใจ 432,943 คนต่อปี นักโภชนบำบัดชี้ นมถั่วเหลืองช่วยลดปัจจัยเสี่ยง.* 20 เมษายน, 2562, จาก กรมสุขภาพจิต: https://www.dmh.go.th/news-dmh/view.asp?id=29507

รัชนา พระนิมิตร, การคัดแยกยีสต์เพื่อผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบอ้อย (วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควชิาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2560), หน้า 62.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2561). *ปาล์มน้ำมัน:เนื้อที่ยืนต้น เนื้อที่ให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2559.* 20 เมษายน, 2562, จาก สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร: http://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/production/oilpalm.pdf

Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology, 90*(4), 1219-1227

Ahnström, J. (2009). *Apolipoprotein M–Studies of Structure and Function* (Vol. 2009): Department of Clinical Chemistry, Lund University.

Bernstein, A. M., Roizen, M. F., & Martinez, L. (2014). Purified palmitoleic acid for the reduction of high-sensitivity C-reactive protein and serum lipids: A double-blinded, randomized, placebo controlled study. *Journal of Clinical Lipidology, 8*(6), 612-617.

Braunwald, T., Schwemmlein, L., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Holmes, W. E., & Claupein, W. (2013). Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by Rhodotorula glutinis. *Applied microbiology and biotechnology, 97*(14), 6581-6588.

Chen, X.-F., Huang, C., Yang, X.-Y., Xiong, L., Chen, X.-D., & 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.

Dallé da Rosa, P., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N., & Valente, P. (2014). Candida zeylanoides as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia microbiologica, 59*(6), 477-484.

Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J., & Lewington, S. (2016). Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circulation Research, 118*(4), 535-546.

Kolouchová, I., Sigler, K., Schreiberová, O., Masák, J., & Řezanka, T. (2015). New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid. *Bioresource Technology, 192*, 726-734.

Leiva-Candia, D. E., Pinzi, S., Redel-Macías, M. D., Koutinas, A., Webb, C., & Dorado, M. P. (2014). The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel, 123*, 33-42.

Patel, A., Arora, N., Sartaj, K., Pruthi, V., & Pruthi, P. (2016). *Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses* (Vol. 62).

Ross, R. (1999). Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine, 340*(2), 115-126.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเพิ่มจำนวนเซลล์

1.1 อาหาร YM (YM medium)

Glucose 10 กรัมต่อลิตร

Peptone 5 กรัมต่อลิตร

yeast extract 3 กรัมต่อลิตร

malt extract 3 กรัมต่อลิตร

(ผงวุ้น 20 กรัมต่อลิตร)

pH 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 103.4 kPa นาน 15 นาที

2. อาหารผลิตน้ำมัน (lipid production medium)

2.1 อาหารซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (glucose – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium)

กลูโคส 50 กรัม/ลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$) 0.1 กรัมต่อลิตร

yeast extract 0.1 กรัมต่อลิตร

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัมต่อลิตร

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot H_2O$) 0.1 กรัมต่อลิตร

pH 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 103.4 kPa นาน 15 นาที

2.2 อาหารซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ตามลำดับ(Glycerol Palm Kernel Waste (GPKW) medium)

2.2.1 Glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium

กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน 0.1 กรัมต่อลิตร

กลีเซอรอล 48 มิลลิลิตรต่อลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$) 0.1 กรัมต่อลิตร

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัมต่อลิตร

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot H_2O$) 0.1 กรัมต่อลิตร

ปรับเป็น pH 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2.2 Glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ medium

กลีเซอรอล 48 มิลลิลิตรต่อลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$) 0.1 กรัมต่อลิตร

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัมต่อลิตร

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot H_2O$) 0.1 กรัมต่อลิตร

ปรับเป็น pH 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2.3 Glycerol – PK medium

กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน 0.2กรัมติอลิตร

กลีเซอรอล 48 มิลลิลิตรต่อลิตร

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัมต่อลิตร

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot H_2O$) 0.1 กรัมต่อลิตร

ปรับเป็น pH 5.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 103.4 kPa นาน 10 นาที

2.3 Glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium

กลีเซอรอล 48 มิลลิลิตร/ลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1 กรัม/ลิตร

yeast extract 0.1 กรัม/ลิตร

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 กรัม/ลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 กรัม/ลิตร

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot H_2O$) 0.1 กรัม/ลิตร

pH 5.5 ท้าให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 103.4 kPa นาน 15 นาที

สารละลาย

chloroform : methanol (2:1 v/v)

chloroform ($CHCl_3$) 400 มิลลิลิตร

methanol (CH_3OH) 200 มิลลิลิตร

0.73% sodium chloride (NaCl)

sodium chloride (NaCl) 2.92 กรัม

น้ำกลัน 400 มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 103.4 kPa นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข.

ตารางข้อมูลดิบ

ตาราง 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ และผลผลิตน้ำมันเมื่อแขวนลอยยีสต์ *Cyberlindnera Subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารผลิตน้ำมันที่แตกต่างกัน

	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ (%กรัม/กรัมเซลล์แห้ง)		ผลผลิตน้ำมันสุทธิ (กรัมต่อลิตร)
	ค่าเฉลี่ย	ค่าการกระจาย	ค่าเฉลี่ย	ค่าการกระจาย	
Day 0 (YM medium)	3.79	0.10	0.31	0.26	0.00
glucose – $(NH_4)_2SO_4$ – YE medium	9.38	0.60	3.95	1.00	0.37
glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium	12.77	2.14	12.55	2.47	1.59
glycerol – $(NH_4)_2SO_4$ – PK medium	12.33	1.35	14.85	2.09	1.85

ตาราง 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์เมื่อเลี้ยงในอาหารกระตุ้นการผลิตน้ำมันที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์แตกต่างกัน ผลผลิตน้ำมัน(%โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักเซลแห้ง) และผลผลิตน้ำมันสุทธิ(กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากการสกัดน้ำมัน

	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ (%กรัม/กรัมเซลล์แห้ง)		ผลผลิตน้ำมันสุทธิ (กรัมต่อลิตร)
	ค่าเฉลี่ย	ค่าการกระจาย	ค่าเฉลี่ย	ค่าการกระจาย	
glycerol - $(NH_4)_2SO_4$ medium	8.36	0.14	15.42	1.07	1.30
glycerol - $(NH_4)_2SO_4$ - PK (0.1 g/L) medium	12.77	2.14	13.69	0.11	1.75
glycerol – PK (0.2 g/L) medium	8.47	0.08	11.95	1.23	1.01