



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์  
*Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ

ชื่อนิสิต นางสาวธนพร อมรพันธุ์วงศ์ เลขประจำตัว 5832321923

ภาควิชา จุลชีววิทยา  
ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)  
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการ

สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์  
*Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูง  
แต่ไนโตรเจนต่ำ

โดย

นางสาวธนพร อมรพันธ์วงศ์ รหัสนิสิต 5832321923

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารช

ปีการศึกษา

2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

 หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ

 อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ  
(ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารช)

 กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

 กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. อัญชริดา สวารช)

# โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

## ชื่อโครงการ

สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์  
*Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ  
Optimization conditions for lipid production of  
*Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 in high carbon but low nitrogen medium

## นิสิตในโครงการ

นางสาวธนพร อมรพันธุ์ รหัสประจำตัวนิสิต 5832321923

## อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารช

โครงการนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ชื่อโครงการ	สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์ <i>Cyberlindnera subsufficiens</i> NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ
ชื่อนิติผู้นำเสนอโครงการ	นางสาวธนพร อมรพันธุ์
เลขประจำตัวนิติ	5832321923
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา สวารชช
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561

---

### บทคัดย่อ

ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลว YM เมื่อค่าความขุ่นเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เริ่มต้นเป็น  $0.501 \pm 0.0006$  จะเพิ่มเป็น  $2.336 \pm 0.029$  ใน 48 ชั่วโมง จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดต่อการนำมาแขวนลอยในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ เพื่อให้ผลิตและสะสมน้ำมัน คือ  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร ให้ผลผลิตน้ำมันสุทธิ  $0.874 \pm 0.211$  กรัมต่อลิตรที่ 6 วัน และเมื่อแปรผันค่าพีเอชของอาหารจาก 5.5 เป็น 7.5 ผลผลิตน้ำมันสุทธิเพิ่มขึ้นเป็น  $1.106 \pm 0.217$  กรัมต่อลิตร

---

คำสำคัญ : อาหารยีสต์มอลต์สกัด จำนวนเซลล์เริ่มต้น

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

**Project title** Optimization conditions for lipid production of  
*Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 in high carbon  
but low nitrogen medium

**Investigator** Ms. Thanaphon Amonphanthang ID 5832321923

**Project advisor** Prof. Ancharida Svarajara, Ph.D.

---

### Abstract

*Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 had the highest growth in YM medium. Initial cell inoculum at optical density of 660 nm ( $0.501 \pm 0.0006$ ) became  $2.336 \pm 0.029$  at 48 h. Optimal inoculum size suspended in high carbon but low nitrogen medium for intracellular oil production was  $2 \times 10^8$  cells/ml. At this condition, oil yield was  $0.874 \pm 0.211$  g/l at 6 days. Increase pH of the medium from 5.5 to 7.5, the oil yield increased to  $1.106 \pm 0.217$  g/l.

---

Keyword : yeast malt extract medium, inoculum size, pH

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนในระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมี ศ.ดร. อัญชริตา สวารช เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

กราบขอบพระคุณ ศ.ดร. อัญชริตา สวารช อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา คอยดูแลช่วยเหลือ ตลอดจนให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการดำเนินการโครงการ ซึ่งส่งผลให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยดูแล ให้กำลังใจ คอยอบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็น สนับสนุนทางการศึกษาอย่างเต็มที่

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนในด้านต่าง ๆ ตลอด ระยะเวลาของการศึกษา

ขอบพระคุณพี่ ๆ ห้อง 1804/15 ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และสอนสิ่งต่างๆ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่องานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอบคุณเพื่อนๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่นที่ 42 ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจกันตลอดมา

ขอขอบคุณ ทีมเพิ่มศักยภาพส่วนงานในด้านการวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้และประสบการณ์อันมีค่า ตลอดระยะเวลาของการศึกษาที่ผ่านมา

นางสาวธนพร อมรพันธุ์

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ .....	ง
สารบัญ .....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญแผนภาพ .....	ช
บทที่ 1.....	1
บทนำ .....	1
บทที่ 2 เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์.....	9
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	15
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	23
เอกสารอ้างอิง.....	24
ภาคผนวก.....	26
ภาคผนวก ก. ....	27
ภาคผนวก ข. ....	28
ภาคผนวก ค. ....	29

## สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

ตารางที่ 4.2.1.1 จำนวนเซลล์เป็น และเซลล์ตายของยีสต์ <i>Cyberlindnera subsufficiens</i> NG 8.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YM.....	16
---	----



สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่	หน้า
แผนภาพที่ 1 อัตราอุบัติการณ์โรคเบาหวานต่อประชากรแสนคนแบ่งตามภูมิภาคของประเทศไทย.....	1
แผนภาพที่ 2 หลอดเลือดหัวใจที่มีไขมันเกาะตามผนังหลอดเลือด.....	2
แผนภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของกรดพาล์มิโตเลอิก.....	3
แผนภาพที่ 4 หยดน้ำมันที่ถูกย้อมด้วย Nile red ภายในเซลล์ยีสต์.....	4
แผนภาพที่ 5 กระบวนการสะสมไขมันในสภาวะที่ขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน และมีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปของยีสต์ <i>โอสี่จีนัส</i> .....	5
แผนภาพที่ 6 การสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง โดย FAS คือ เอนไซม์ Fatty acid synthase 9.....	6
แผนภาพที่ 4.1 ผลของอาหารเหลวแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์ <i>Cyberlindnera subsufficiens</i> NG 8.2 .....	15
แผนภาพที่ 4.2.1.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง(ก) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์(ข) และผลผลิตน้ำมันสุทธิ(ค) ของยีสต์ <i>Cyberlindnera subsufficiens</i> NG 8.2 เมื่อแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่แขวนลอย ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ	
(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง.....	17
(ข) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์.....	18
(ค) ผลผลิตน้ำมันสุทธิ.....	19

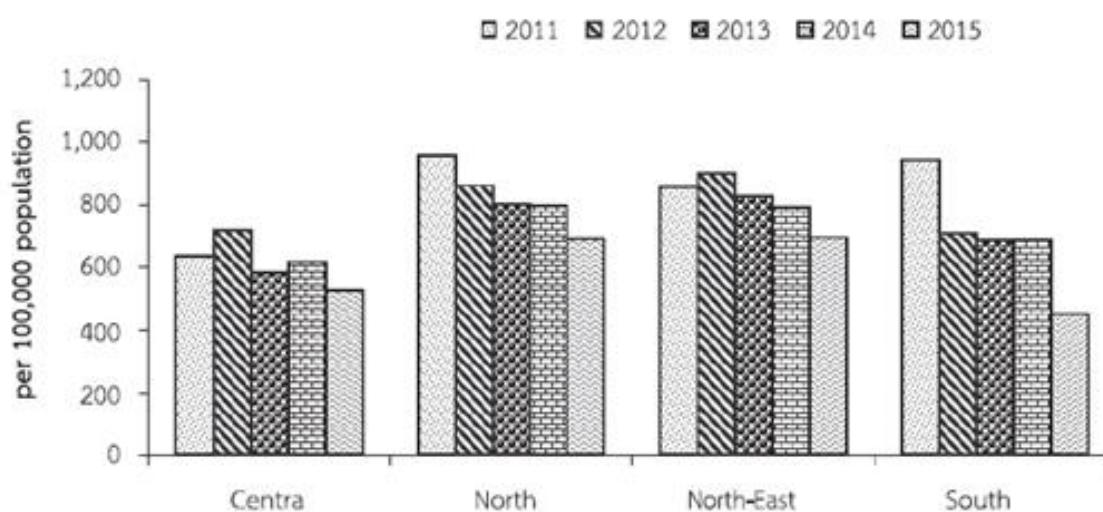
แผนภาพที่ 4.2.2 ผลน้ำหนักรเซลล์แห้ง(ก) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์(ข) และผลผลิตน้ำมันสุทธิ(ค)  
ของการแปรรูปค่าพีเอชของอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ

(ก) น้ำหนักรเซลล์แห้ง.....	20
(ข) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์.....	21
(ค) ผลผลิตน้ำมันสุทธิ.....	22

## บทที่ 1 บทนำ

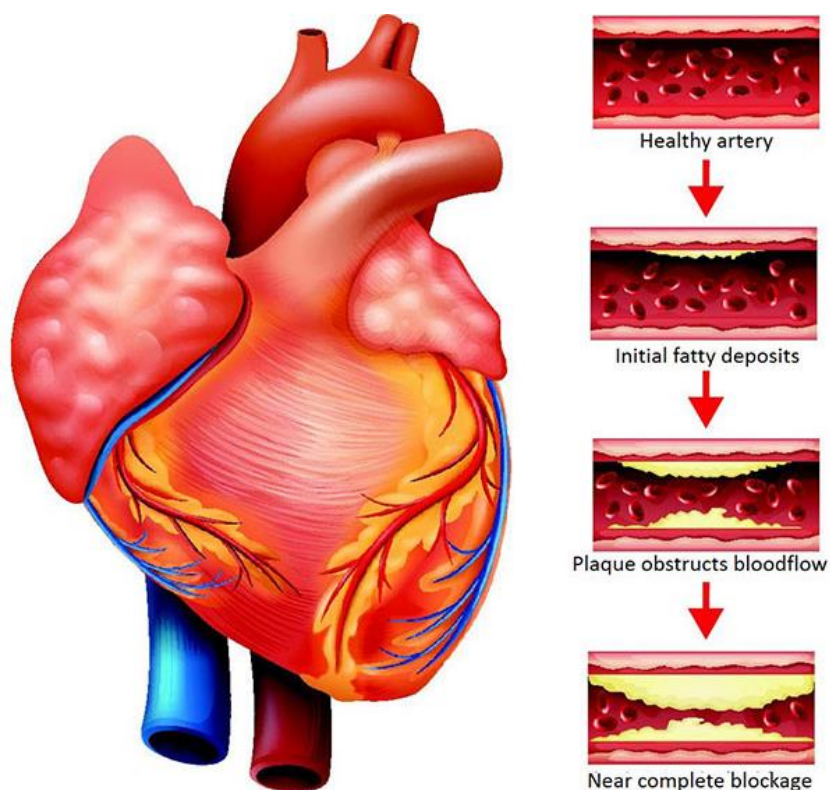
### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ในปัจจุบันนี้มีโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง 5 โรค ส่งผลกระทบต่อระบบสาธารณสุขของประเทศไทย ซึ่ง 5 โรคสำคัญ ดังกล่าว ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง โรคมะเร็ง และอีกหนึ่งโรคที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง คือ โรคเบาหวาน และภาวะแทรกซ้อนของโรค มีผลกระทบทางสังคมอย่างมากอันเนื่องมาจาก อัตราการเสียชีวิต และคุณภาพของประชากรเพิ่มขึ้น (ที่มา: [www.msd-thailand.com/our-work/Diabetes/](http://www.msd-thailand.com/our-work/Diabetes/), accessed on Mar 16,2019) โรคเบาหวานโดยหลักๆ แบ่งเป็น 2 ชนิด 1) โรคเบาหวานที่เกิดจากตับอ่อนไม่สามารถสร้างอินซูลินได้เลย พบบ่อยในเด็กหรือวัยรุ่น ซึ่งเกี่ยวข้องกับความผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย การรักษาเนื่องจากตับอ่อนไม่สามารถผลิตอินซูลินได้ จึงต้องฉีดอินซูลินตลอดชีวิต และ 2) โรคเบาหวานที่เกิดจากภาวะดื้อต่ออินซูลินและตับอ่อนสร้างอินซูลินได้ไม่เพียงพอ พบบ่อยในผู้ใหญ่อายุ 40 ปีขึ้นไป บางครั้งไม่แสดงอาการใดๆ ซึ่งในประเทศไทยพบมากกว่า 90% วิธีการรักษา ได้แก่ การควบคุมอาหาร ซึ่งมีผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ประมาณ 40% ที่ต้องฉีดอินซูลินร่วมด้วย



ภาพที่ 1 อัตราอุบัติการณ์โรคเบาหวานต่อประชากรแสนคนแบ่งตามภูมิภาคของประเทศไทย  
(ที่มา: [www.msd-thailand.com/our-work/Diabetes/](http://www.msd-thailand.com/our-work/Diabetes/), accessed on Mar 16,2019)

โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด เกิดจากการมีไขมันสะสมแล้วก่อตัวเป็นแผ่นไขมันที่ผนังหลอดเลือดแดงใหญ่ ส่งผลให้หลอดเลือดแดงแคบลง เลือดที่จะไปเลี้ยงอวัยวะสำคัญ เช่น หัวใจ และสมองลดลง โรคหลอดเลือดหัวใจในปัจจุบันเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วย และการตายเป็นอันดับต้นๆของทุกประเทศทั่วโลก พบผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือดมากถึง 22 ล้านคนในแต่ละปี ปัจจุบันโรคไขมันในเลือดสูงจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประชากรทั่วโลก โรคหนึ่ง ที่นำไปสู่สาเหตุสำคัญของโรคเรื้อรังต่าง ๆ ที่เป็น ปัญหาต่อสุขภาพ และเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลสูงมาก (ที่มา: <https://medthai.com/โรคหลอดเลือดหัวใจ/>, accessed on Mar 16,2019) การรักษาในปัจจุบันใช้การให้ยาเพื่อลดระดับคอเลสเตอรอล และยาลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด

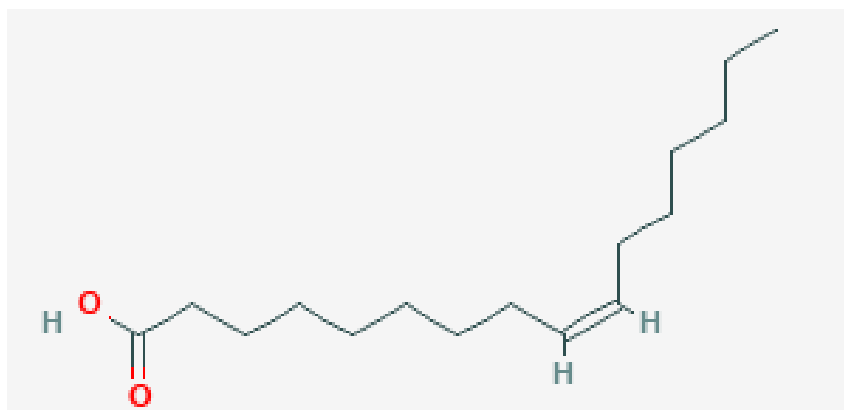


ภาพที่ 2 หลอดเลือดหัวใจที่มีไขมันเกาะตามผนังหลอดเลือด

(ที่มา: <https://medthai.com/โรคหลอดเลือดหัวใจ/>, accessed on Mar 16,2019)

มีรายงานว่า กรดปาลมิโตเลอิก (palmitoleic acid) ช่วยลดการดื้อต่ออินซูลินซึ่งเป็นสาเหตุหลักของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ทำให้ในตับและกล้ามเนื้อ มีความไวต่ออินซูลินมากขึ้น ซึ่งช่วยลดการสะสมของน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Cao H และคณะ, 2008) นอกจากนี้กรดปาลมิโตเลอิกยังช่วยลดการสะสมของไขมันไตรกลีเซอไรด์ (Cao H และคณะ, 2008) โดยระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ที่ปกติ จะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดและภาวะตับอ่อนอักเสบได้ และกรดปาลมิโตเลอิกช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์สลายไขมัน (lipolysis) และลดการทำงานของเซลล์สร้างไขมัน (lipogenesis) ในเซลล์ไขมันอีกด้วย (Bolsoni-Lopes A และคณะ ,2013)

กรดปาลมิโตเลอิก (palmitoleic acid) พบได้ในน้ำมันปลา ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว หรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า MUFA แต่ข้อจำกัดในเรื่องของการเพาะเลี้ยง จึงเป็นเหตุให้ยีสต์เข้ามามีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ กรดปาลมิโตเลอิก เนื่องจากยีสต์มีวงจรชีวิตที่สั้น มีอัตราการเจริญที่รวดเร็ว สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ได้อย่างหลากหลาย เช่น เศษซากวัสดุที่เหลือทิ้งจากการเกษตร (lignocellulose) กลีเซอรอล (glycerol) ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น

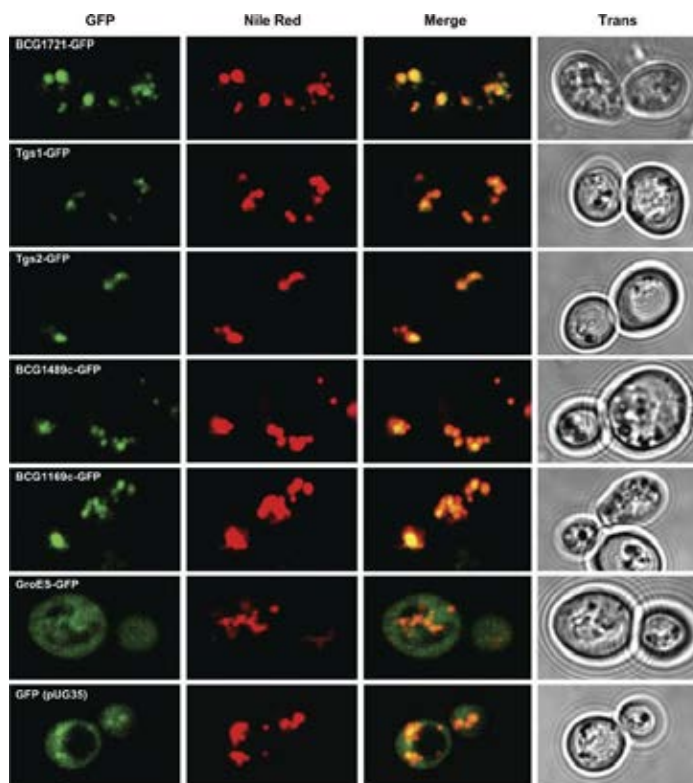


ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของกรดปาลมิโตเลอิก

(ที่มา: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/palmitoleic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/palmitoleic_acid), accessed on Mar 16,2019)

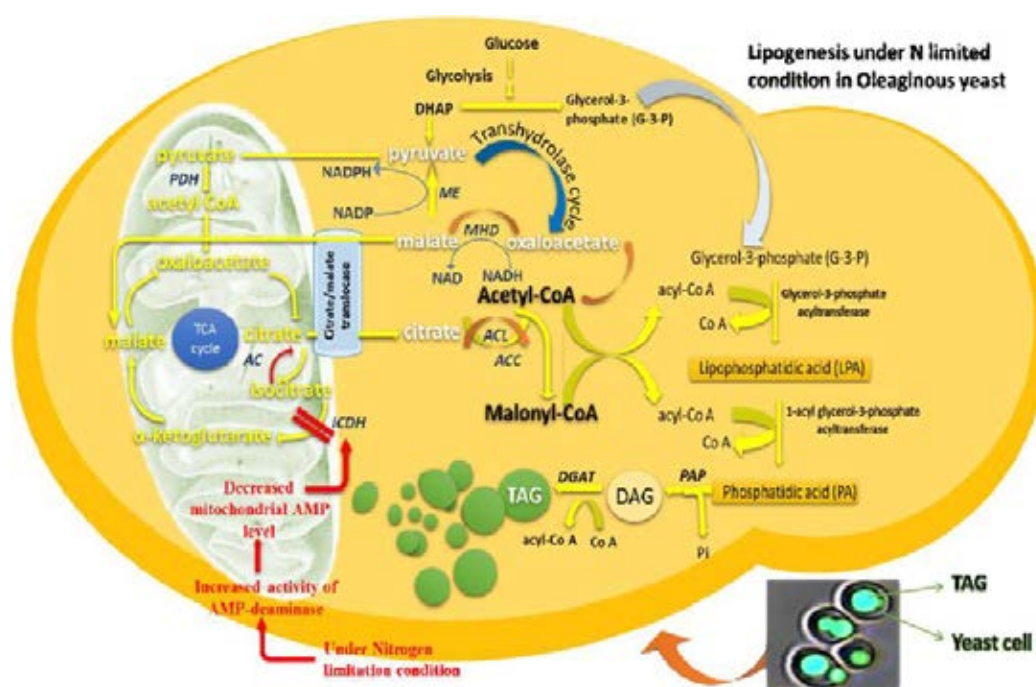
ยีสต์โดยทั่วไปผลิตไขมันประมาณ 6-8% ของน้ำหนักแห้ง โดยไขมันที่ผลิตเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของ cell membrane ยีสต์บางชนิด ในสภาวะที่มีคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีไนโตรเจนต่ำ จะผลิตและสะสมไขมันในเซลล์ปริมาณสูง เรียกยีสต์ซึ่งสะสมน้ำมันภายในเซลล์มากกว่า 20% w/w, cell dry weight ว่ายีสต์โอเลจิเนส (oleaginous yeast) ไขมันที่สะสมส่วนใหญ่เป็น triglycerols (TAG) ในรูป oil droplet (Galafassi และคณะ, 2012) ตัวอย่างยีสต์โอเลจิเนสที่มีรายงาน เช่น *Lipomyces starkeyi*, *Mortierella isabellina*, *Trichosporon fermentans* (Lin และคณะ, 2014)

ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 สะสมไขมันที่มีองค์ประกอบเป็น กรดเททราเดคาโนอิก 0.52% กรดปาล์มิติก 26.32% กรดปาล์มิโตเลอิก 22.25% กรดสเตียริก 0.69% กรดโอเลอิก 34.64% กรดลิโนเลอิก 12.21% กรดแอลฟาไลโนเลนิก 1.89% และกรดไขมันอื่นๆ 1.48% (รัชนา พระนิมิต 2561)



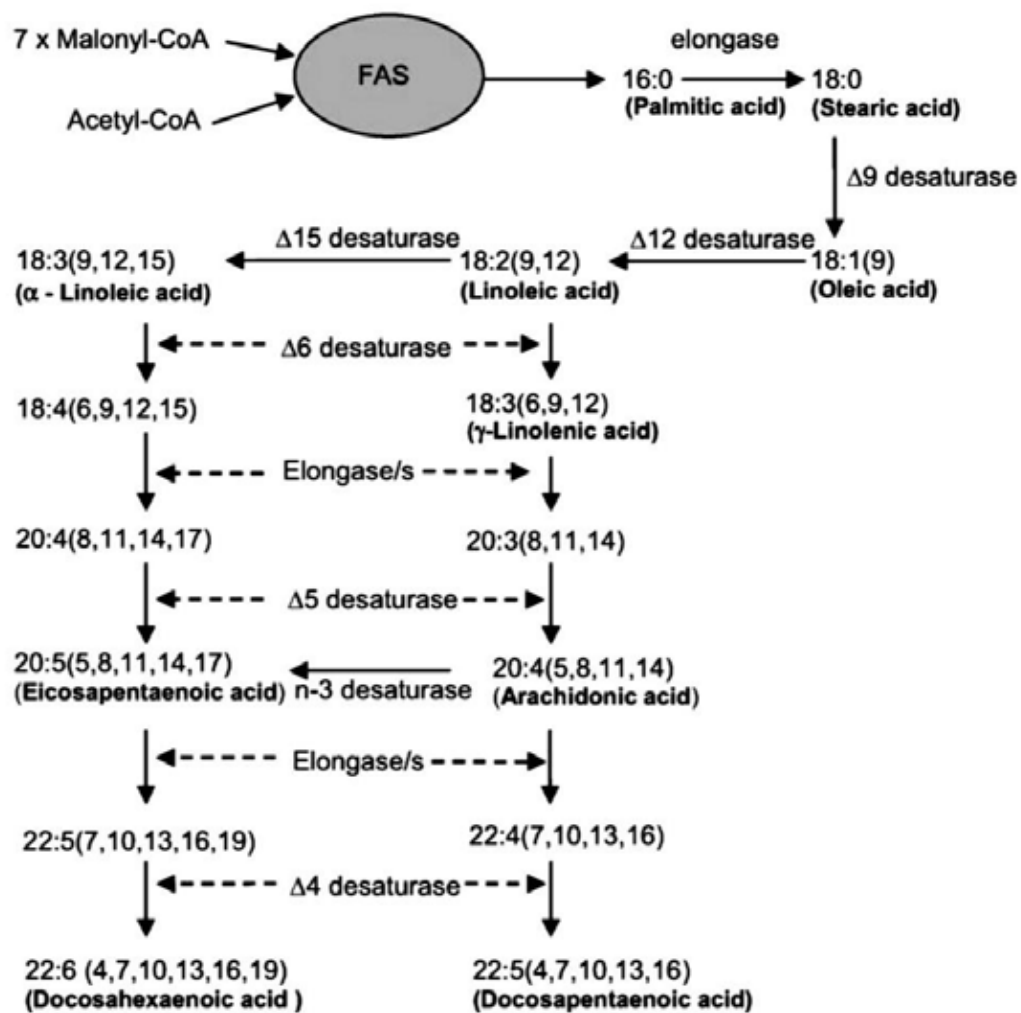
ภาพที่ 4 หยดน้ำมันที่ถูกย้อมด้วย Nile red ภายในเซลล์ยีสต์ (Low et al., 2010)

ยีสต์โอลีจิ้นัส (oleaginous yeast) จะสะสมไขมันในสภาวะที่มีการขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน และมีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป ทำให้สาร AMP (adenosine monophosphate) ถูกดึงหมู่แอมโมเนียออกมาเพื่อใช้ในเซลล์ โดยเอนไซม์ AMP deaminase (Christopher T. Evans และคณะ, 1983) ปริมาณของ AMP ที่ลดลงส่งผลต่อปริมาณของ ADP (adenosine diphosphate) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์ ATP ของเซลล์ ทำให้เซลล์ของยีสต์โอลีจิ้นัสหยุดการเพิ่มจำนวนและเริ่มกระบวนการการสะสมไขมัน ผลจากวัฏจักร TCA ที่หยุดลงทำให้เกิดการสะสมของ citrate ภายในเซลล์มากขึ้น เอนไซม์ citrate/malate translocase (CMT) ที่ผนังไมโทคอนเดรียจะทำหน้าที่ส่ง citrate ออก และรับ malate เข้ามาในไมโทคอนเดรีย จากนั้น citrate จะถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA และ oxaloacetate (OAA) โดยเอนไซม์ ATP:citrate lyase (ACL) จากนั้น oxaloacetate ถูกเปลี่ยนเป็น malate โดยเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH) ซึ่งจะถูกนำไปสร้าง NADPH โดย malic enzyme (ME) โดย NADH ที่ได้จะเป็นสารตั้งต้นหนึ่งร่วมกับ acetyl-CoA และ malonyl-CoA เพื่อสังเคราะห์เป็น palmitate (Boulton และ Ratledge, 1981; Ratledge, 2004)



ภาพที่ 5 กระบวนการสะสมไขมันในสภาวะที่ขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน และมีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปของยีสต์โอลีจิ้นัส

(ที่มา: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-lipogenesis-in-oleaginous-yeast-and-role-of-citrate-and-malate-as\\_fig4\\_303322359](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-lipogenesis-in-oleaginous-yeast-and-role-of-citrate-and-malate-as_fig4_303322359), accessed on Mar 16,2019)



ภาพที่ 6 การสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง โดย FAS คือ เอนไซม์

Fatty acid synthase 9 (Ratledge, 2004)



การเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อการผลิตน้ำมันใช้วิธีการเลี้ยงแบบ two stage fermentation (Lin และคณะ, 2014) โดยในขั้นแรกจะเลี้ยงเพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์จำนวนมากๆ และขั้นตอนที่สองจะเป็นการเลี้ยงเพื่อให้เกิดการสะสมไขมันภายในเซลล์ โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ของยีสต์ขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อมหลายอย่าง คือ 1) องค์ประกอบของอาหาร 2) อุณหภูมิการเพาะเลี้ยง 3) ค่าพีเอชของอาหาร และ 4) การให้อากาศเป็นต้น ซึ่งหากเซลล์ยีสต์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น องค์ประกอบของอาหารก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ก็จะก่อให้เกิดความเครียดภายในเซลล์เนื่องจากสภาพแวดล้อม (environmental stress) หรือค่าพีเอชที่ต่ำหรือสูงมากเกินไป ก็จะก่อให้เกิด oxidative stress ภายในเซลล์ส่งผลให้เซลล์ยีสต์หยุดการเจริญเติบโต หรือเซลล์ยีสต์ตาย (Xiang-feng Huang et al.,2018) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการสะสมน้ำมันของยีสต์ คือ 1) องค์ประกอบของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน 2) อุณหภูมิการเลี้ยง 3) ค่าพีเอชของอาหาร (Imayuli และคณะ, 2014) 4) การให้อากาศ (aeration) 5) แร่ธาตุต่างๆ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญและสะสมน้ำมันของยีสต์ (Yi-Huang และคณะ, 2015) ซึ่งหากเซลล์ยีสต์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเช่น ค่าพีเอชของอาหารต่ำ หรือสูงมากเกินไปก็จะส่งผลต่อปริมาณการผลิตและสะสมน้ำมัน (Xiang-feng Huang et al.,2018)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

หาสภาวะบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิต และสะสมน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ

## บทที่ 2

### เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์

#### 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1.1 กล้องจุลทรรศน์เชิงประกอบชนิดใช้แสง (light compound microscope) รุ่น CH30  
บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.2 เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated incubator shaker) รุ่น innova® 4300  
บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.1.3 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate magnetic stirrer) รุ่น 502P-2  
บริษัท PMC ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG6002-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตซ์เซอร์แลนด์
- 2.1.5 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตซ์เซอร์แลนด์
- 2.1.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-352 และ ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Japan และ  
รุ่น HV-25 บริษัท HiRaYaMa ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.7 เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge)  
รุ่น 6500 บริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (high speed refrigerated centrifuge)  
รุ่น 5922 บริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้สำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก  
(high speed refrigerated microtube centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota  
ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.11 เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบเยือกแข็ง (lyophilizer) รุ่น EYELA FD-1 บริษัท Tokyo  
Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.12 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S-20K บริษัท Mettler Toledo ประเทศ  
สวิตซ์เซอร์แลนด์
- 2.1.13 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S-UV-VIS  
บริษัท Thermo Scientific Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 2.1.14 เครื่องวิเคราะห์สารชีวเคมี (biochemistry analyzer) รุ่น 7100 MBS บริษัท YSI  
ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.1.15 ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ -20 องศาเซลเซียส (freezer) Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.1.16 ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ -80 องศาเซลเซียส (freezer) Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.1.17 ตู้ดูดควัน (fume hood) Dalton Co. Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.18 ตู้ป่ม (incubator) SANYO ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.19 ตู้ดูดไอสารระเหยสารเคมี (fume Hood) บริษัท Flexlab ประเทศไทย
- 2.1.20 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) บริษัท Lab service ประเทศไทย
- 2.1.21 ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific ประเทศนิวซีแลนด์
- 2.1.22 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ES-215 TOMY Digital Biology Co. Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.23 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) SS-325, TOMY Digital Biology Co. Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
- 2.1.24 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร  
บริษัท Eppendorf ประเทศไทย
- 2.1.25 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 5000 ไมโครลิตร บริษัท Mettler Toledo  
ประเทศสวิตซ์เซอร์แลนด์
- 2.1.26 อ่างส่งคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น Elma E30H บริษัท Tovatech  
ประเทศสหรัฐอเมริกา

## 2.2 เคมีภัณฑ์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 2.2.1 คลอโรฟอร์ม (chloroform:  $\text{CHCl}_3$ ) บริษัท V.S. Chem house ประเทศไทย
- 2.2.2 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: HCl) บริษัท Sigma Inc ประเทศเยอรมนี
- 2.2.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH) Merck Co. Ltd ประเทศเยอรมนี
- 2.2.4 กลูโคส (D-glucose:  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) บริษัท Sigma Inc ประเทศเยอรมนี
- 2.2.5 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl) บริษัท Merck Co. Ltd ประเทศเยอรมนี
- 2.2.6 เพปโตน (peptone) บริษัท Becton Co. Ltd ประเทศเยอรมนี
- 2.2.7 เมทานอล (methanol:  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) บริษัท V.S. Chem house ประเทศไทย

- 2.2.8 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )  
บริษัท Merck Co. Ltd ประเทศเยอรมนี  
วุ้นผง (agar) บริษัท Becton ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.2.9 สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท Becton, Dickinson & Company  
ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.2.10 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Becton Co. Ltd ประเทศเยอรมนี
- 2.2.11 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate:  $(NH_4)_2SO_4$ ) บริษัท Merck Co. Ltd  
ประเทศเยอรมนี
- 2.2.12 แคลเซียมคลอไรด์ (calcium Chloride:  $CaCl_2$ ) Merck Co. Ltd. ประเทศเยอรมนี
- 2.2.13 เอทานอล (ethanol 99% (ปริมาตร/ปริมาตร)) Sigma Inc. ประเทศเยอรมนี
- 2.2.14 กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน

## 2.3 เชื้อจุลินทรีย์

*Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 (รัชนา พระนิมิต 2561)

### บทที่ 3

#### วิธีการทดลอง

#### 3.1 การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับเตรียมหัวเชื้อ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

3.1.1 ถ่ายโอนยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว 3 ชนิด คือ อาหารเหลว YM (กลูโคส 10 กรัม/ลิตร, มอลต์สกัด 3 กรัม/ลิตร, เปปโทน 5 กรัม/ลิตร และยีสต์สกัด 3 กรัม/ลิตร), อาหารเหลวกลูโคส 30 กรัม/ลิตร ที่มียีสต์ไนโตรเจนพื้นฐาน 0.67กรัม/ลิตร (G+YNB) และอาหารเหลวกลูโคส 30 กรัม/ลิตร ที่มีกากเมล็ดปาล์มน้ำมัน 99 กรัม/ลิตร (G+PKW) โดยกากเมล็ดปาล์มน้ำมันผ่านการให้ความร้อนไอน้ำอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 100 KPa นาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 9803 × g นาน 30 นาที และนำส่วนใสไปกรองผ่าน whatman filter paper no.1 ก่อนนำไปรวมกับสารละลายกลูโคส ทำให้อาหาร G+PKW ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนไอน้ำอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที อาหาร YM และ G+YNB ทำให้อาหารปราศจากเชื้อด้วยความร้อนไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 100 KPa นาน 15 นาที พีเอชของอาหารเป็น 5.5 ค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเป็น 0.5 ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 จากค่าความขุ่นของเซลล์ในอาหารแต่ละชนิด

#### 3.2 การหาสภาวะบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิตและสะสมน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

##### 3.2.1 การแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น $2 \times 10^7$ $2 \times 10^8$ และ $2 \times 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.2.1.1 ถ่ายโอนยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็ง YM ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ค่าความขุ่นเซลล์เริ่มต้นเป็น 0.8 เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดิม วัดค่าความขุ่นของเซลล์โดยการเจือจางเซลล์ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 100 KPa นาน 15 นาที ย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ นับจำนวนเซลล์ซึ่งย้อมไม่ติดสีย้อม (เซลล์มีชีวิต) และจำนวนเซลล์ซึ่งย้อมติดสีย้อม (เซลล์ที่ตายแล้ว) ในชั่วโมงเริ่มต้นและเมื่อครบ 48 ชั่วโมง

3.2.1.2 เพาะเลี้ยงยีสต์ตามวิธีข้อ 3.2.1.1 ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ตามจำนวนที่ต้องการ (ข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.2.1.1) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3.2.1.3 นำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ (C/N ratio = 500) ประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัม/ลิตร ยีสต์สกัด 0.1 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.1 กรัม/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม/ลิตร พีเอช 5.5 (Tanimura และคณะ, 2014) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลากส์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ตามจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่กำหนด บ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 6 วัน ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ ทำให้เซลล์แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ชั่งน้ำหนักแห้ง สกัดน้ำมันจากเซลล์แห้ง ด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ตามวิธีของ Kitcha และคณะ (2011) แขนวลอย เซลล์แห้งเยือกแข็ง 0.5 กรัม ในสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (อัตราส่วน 2:1 v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (37 กิโลเฮิร์ต) เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 7.3 กรัม/ลิตร เพื่อให้ได้สารผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (อัตราส่วน 2 : 1 : 0.8 v/v/v) (Axelsson และ Gentili, 2014) ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์  $11104 \times g$  นาน 10 นาที ดูดเก็บส่วนใสชั้นล่าง ระเหยสารละลายที่ได้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักน้ำมันที่สกัดมาได้

### 3.2.2 การแปรผันค่าพีเอชของอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ

3.2.2.1 เตรียมหัวเชื้อยีสต์ตามวิธีข้อ 3.2.1.1 นำไปเลี้ยงต่อในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ ตามจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่คัดเลือกได้ (ผลจากข้อ 3.2.1) แปรผันค่าพีเอชของอาหารที่มีคาร์บอนสูง แต่ไนโตรเจนต่ำเป็น 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 สกัดน้ำมันจากเซลล์ยีสต์และเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันที่สกัดได้

### 3.3 การคำนวณหาปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ และผลผลิตน้ำมันสุทธิ

$$\text{ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์} \left( \% \left( \frac{\text{กรัม}}{\text{กรัม}} \right) \right) = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์ที่ใช้ในการสกัดน้ำมัน (กรัม)}} \times 100$$

$$\text{ผลผลิตน้ำมันสุทธิ} \left( \frac{\text{กรัม}}{\text{ลิตร}} \right) = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเซลล์ที่ใช้ในการสกัดน้ำมัน (กรัม)}} \times \text{น้ำหนักเซลล์ทั้งหมด} \left( \frac{\text{กรัม}}{\text{ลิตร}} \right)$$

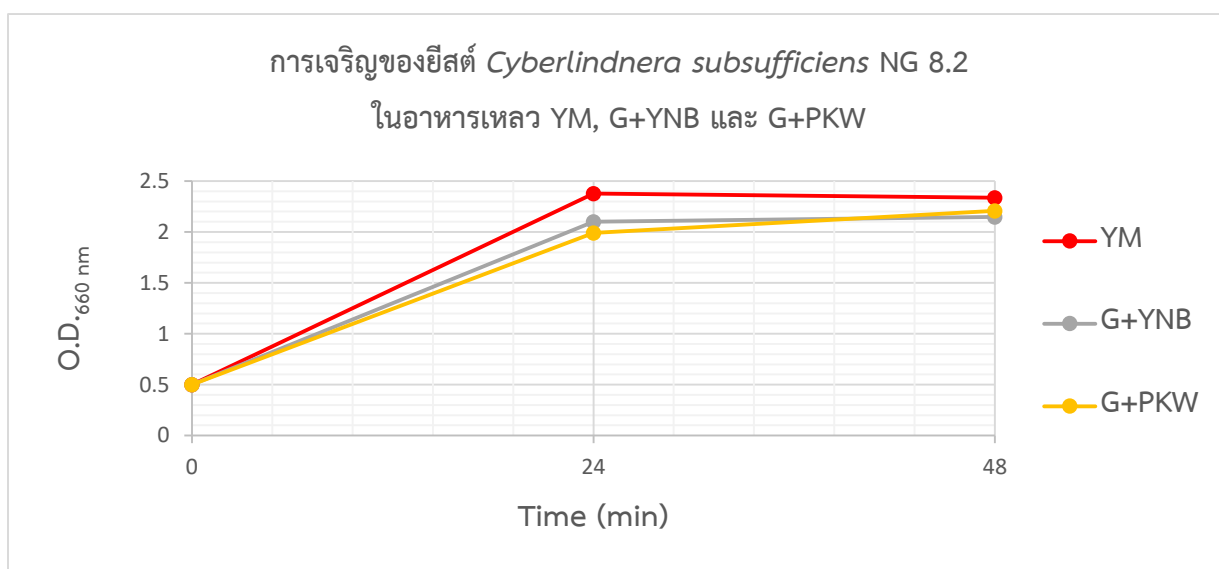


## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลของอาหารที่เหมาะสมสำหรับเตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

เมื่อเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารเหลว YM, G+YNB และ G+PKW เพื่อหาอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญ พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวทุกชนิดโดยในอาหารเหลว YM ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 สามารถเจริญได้ดีที่สุด ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ชั่วโมงที่ 48 สูงสุด เท่ากับ  $2.336 \pm 0.029$



**แผนภูมิที่ 4.1** การเจริญของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารเหลวชนิดต่างๆ (อาหารเหลวยีสต์มอลต์สกัด (YM) อาหารเหลวกลูโคสที่มียีสต์ในโตรเจนพื้นฐาน (G+YNB) และอาหารเหลวกลูโคสที่มีกากเมล็ดปาล์มน้ำมัน (G+PKW))

## 4.2 ผลของสภาวะบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิต และสะสมน้ำมันของยีสต์

### *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

#### 4.2.1 ผลการแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้น

ผลการเลี้ยงยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารเหลว YM จากจำนวนเซลล์เป็นเริ่มต้น  $4.225 \times 10^7 \pm 1.676 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรเมื่อครบ 48 ชั่วโมงได้จำนวนเซลล์เป็น  $4.395 \times 10^8 \pm 7.934 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตาราง 4.2.1.1 แสดงจำนวนเซลล์เป็นและเซลล์ตายที่ได้ ที่ชั่วโมงเริ่มต้นและที่ 48 ชั่วโมง

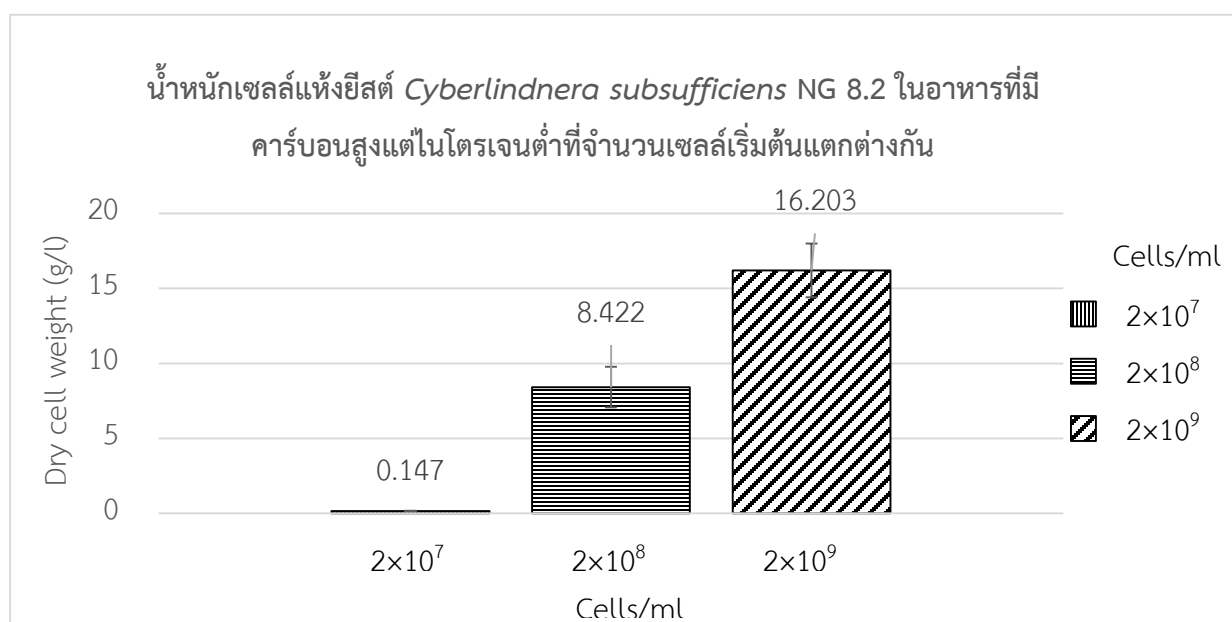
ตารางที่ 4.2.1.1 จำนวนเซลล์เป็น และเซลล์ตายของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YM

ชั่วโมงที่	จำนวนเซลล์เป็น (cells/ml)	จำนวนเซลล์ตาย (cells/ml)	จำนวนเซลล์เป็น (cells/50ml)	จำนวนเซลล์ตาย (cells/50ml)
0	$4.225 \times 10^7 \pm 1.676 \times 10^6$	$1.167 \times 10^5 \pm 1.010 \times 10^5$	$2.113 \times 10^9 \pm 8.378 \times 10^7$	$5.833 \times 10^6 \pm 5.052 \times 10^6$
48	$4.395 \times 10^8 \pm 7.934 \times 10^7$	$3.167 \times 10^6 \pm 1.942 \times 10^6$	$2.198 \times 10^{10} \pm 3.967 \times 10^9$	$1.583 \times 10^8 \pm 9.709 \times 10^7$

4.2.1.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง(ก) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์(ข) และผลผลิตน้ำมันสุทธิ(ค) ของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่แขวนลอยในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ

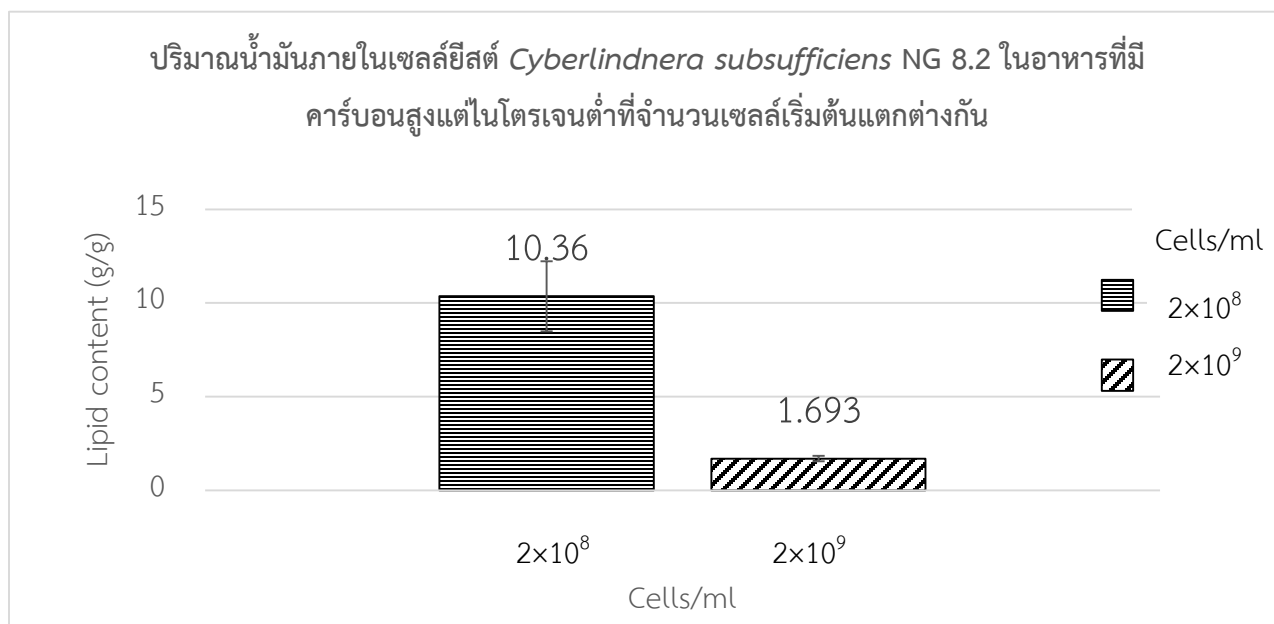
ผลการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ โดยเลี้ยงหัวเชื้อยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารเหลว YM และแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่แขวนลอยเป็น  $2 \times 10^7$   $2 \times 10^8$  และ  $2 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุด พบว่าการใช้จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้น  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ผลผลิตน้ำมันสุทธิมากที่สุด  $0.874 \pm 0.211$  กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์มากที่สุดร้อยละ  $10.36 \pm 1.872$  กรัม/กรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักแห้งของเซลล์  $8.422 \pm 1.366$  กรัมต่อลิตร

(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง



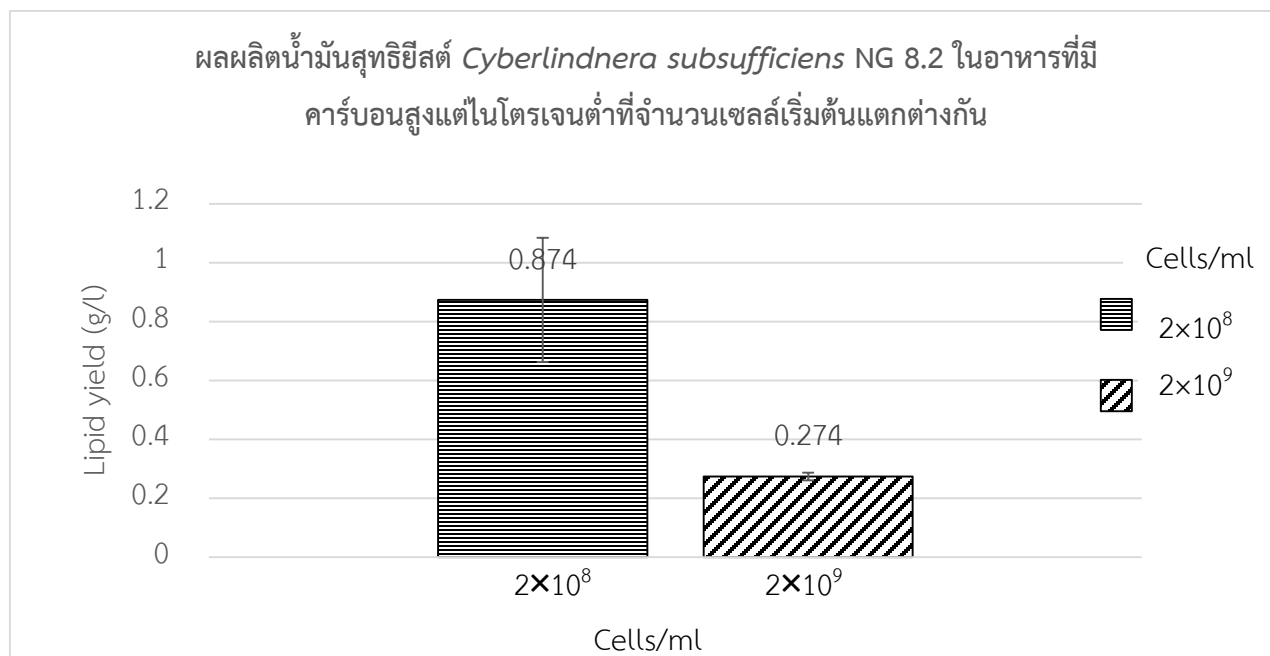
แผนภูมิที่ 4.2.1.2 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่แขวนลอยในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำเป็น  $2 \times 10^7$   $2 \times 10^8$  และ  $2 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

## (ข) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์



แผนภูมิที่ 4.2.1.2 (ข) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่แขวนลอยในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำเป็น  $2 \times 10^7$   $2 \times 10^8$  และ  $2 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

## (ค) ผลผลิตน้ำมันสุทธิ

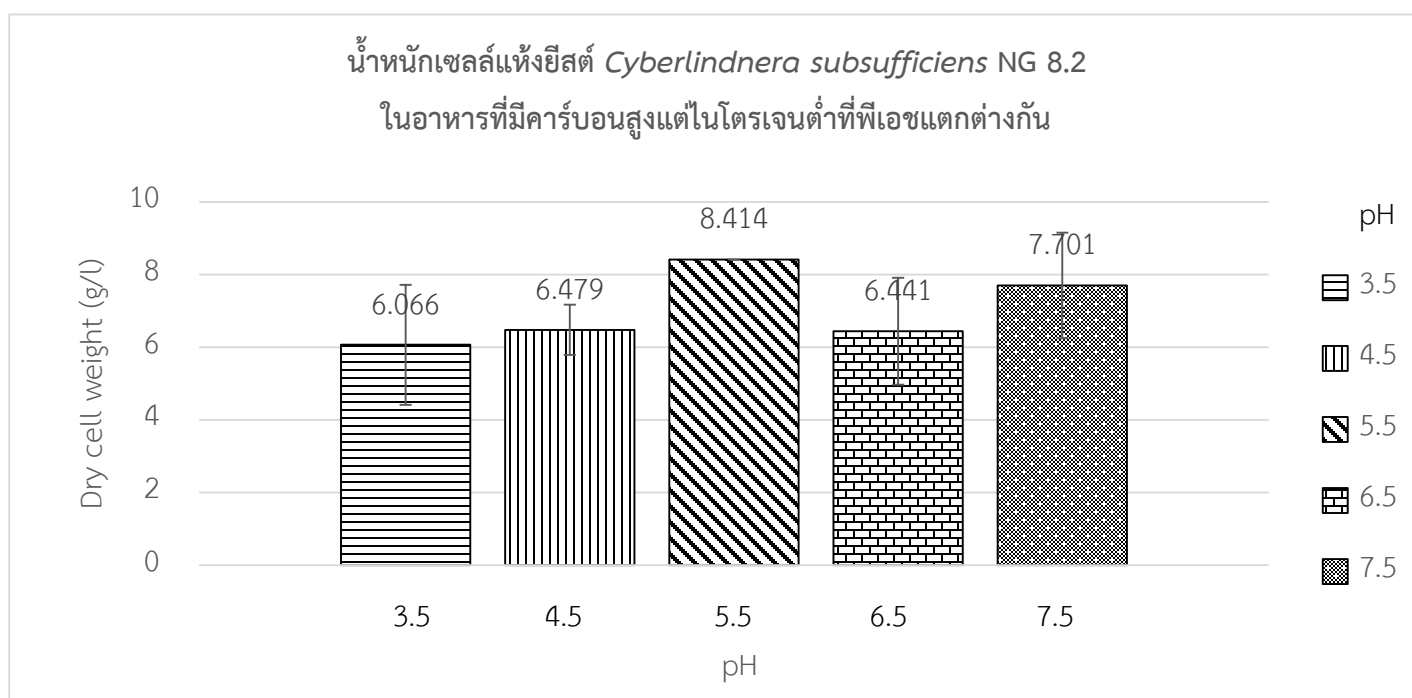


แผนภูมิที่ 4.2.1.2 (ค) ผลผลิตน้ำมันสุทธิยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่แขวนลอยในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำเป็น  $2 \times 10^7$   $2 \times 10^8$  และ  $2 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

#### 4.2.2 ผลน้ำหนักเซลล์แห้ง(ก) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์(ข) และผลผลิตน้ำมันสุทธิ(ค) ของการแปรผันค่าพีเอชของอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ

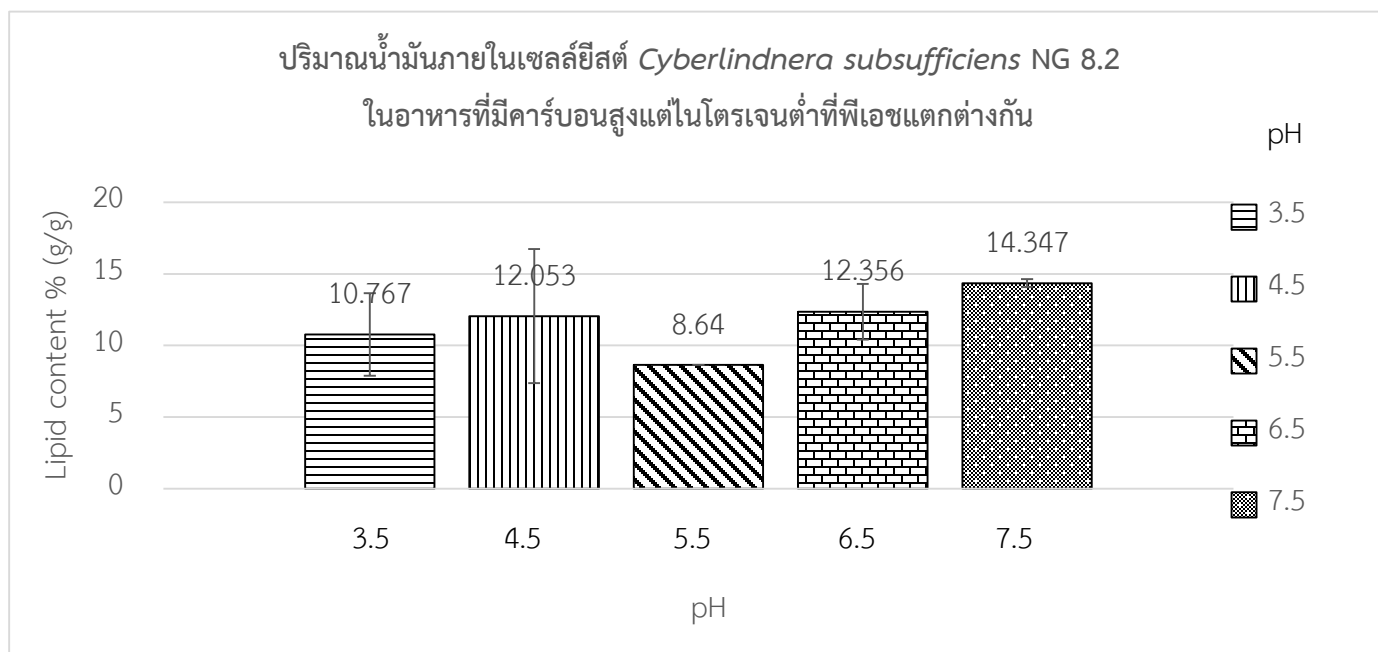
ผลการผลิตน้ำมันยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูง แต่ไนโตรเจนต่ำ โดยหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นเลี้ยงในอาหาร YM ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นแขวนลอย  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และแปรผันค่าพีเอชของอาหารเป็น 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 พบว่าค่าพีเอช 7.5 ให้ผลผลิตน้ำมันสุทธิ % ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็น  $1.106 \pm 0.217$  กรัมต่อลิตร,  $14.347 \pm 0.281$  กรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และ  $7.701 \pm 1.453$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

##### (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง



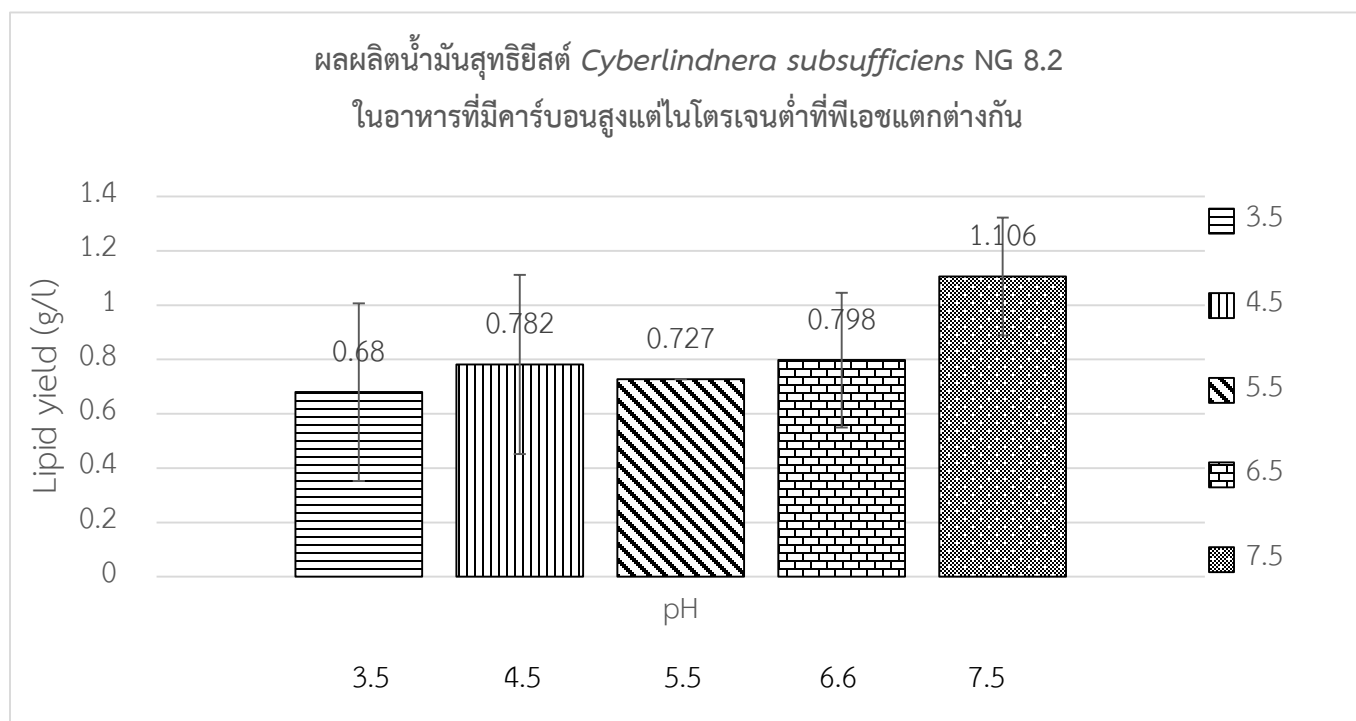
แผนภูมิที่ 4.2.2 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำเมื่อพีเอชเป็น 3.5 4.5 5.5 6.5 และ 7.5

## (ข) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์



แผนภูมิที่ 4.2.2 (ข) ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำเมื่อพีเอชเป็น 3.5 4.5 5.5 6.5 และ 7.5

## (ค) ผลผลิตน้ำมันสุทธิ



แผนภูมิที่ 4.2.2 (ค) ผลผลิตน้ำมันสุทธิยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำเมื่อพีเอชเป็น 3.5 4.5 5.5 6.5 และ 7.5



## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 ในอาหาร 3 ชนิด คือ อาหารยีสต์มอลต์สกัด (YM medium), อาหารกลูโคสที่มียีสต์ในโตรเจนพื้นฐาน (G+YNB) และอาหารกลูโคสที่มีกากเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งไนโตรเจน (G+PKW) พบว่ายีสต์เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร YM โดยเมื่อค่าความขุ่นเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเริ่มต้นเท่ากับ 0.501 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่าความขุ่นเซลล์จะเพิ่มขึ้นเป็น 2.34 ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาหาร YM ประกอบด้วย กลูโคส ยีสต์สกัด มอลต์สกัด และเพปโทน โดยกลูโคสถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญและการดำรงชีพของจุลินทรีย์ ยีสต์สกัด ประกอบด้วย โปรตีน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และลิพิด เป็นแหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์ซึ่งใช้ในการสร้างองค์ประกอบภายใน เช่น กรดนิวคลีอิก มอลต์สกัด องค์ประกอบหลักๆ คือ คาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลฟรุกโทสร้อยละ 1-2 กลูโคสร้อยละ 7-10 ซูโครสร้อยละ 1-3 และน้ำตาลมอลโทสร้อยละ 39-42 โปรตีนร้อยละ 6 และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุ เพปโทน คือ โปรตีน ที่มีกรดอะมิโนต่างๆมากมาย เช่น อะลานีน ฟีนิลอะลานีน ไกลซีน ลูซีน และไลซีน เป็นต้น เป็นแหล่งพลังงานสำคัญสำหรับการเจริญของเซลล์

จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดต่อการนำมาแขวนลอยในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำเพื่อให้ผลิตและสะสมน้ำมันคือ  $2 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นความหนาแน่นเซลล์ที่เหมาะสม ไม่มากเกินไปอันจะก่อให้เกิดการแย่งสารอาหาร หรือน้อยเกินไปซึ่งจะทำให้ผลผลิตน้ำมันสุทธิซึ่งแปรผันตามจำนวนเซลล์ลดลง ได้ผลผลิตน้ำมันสุทธิ  $0.874 \pm 0.211$  กรัมต่อลิตร และเมื่อแปรผันค่าพีเอชของอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำจาก 5.5 เป็น 7.5 ผลผลิตน้ำมันสุทธิเพิ่มขึ้นเป็น  $1.106 \pm 0.217$  กรัมต่อลิตร อาจเป็นเพราะเป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการชีวสังเคราะห์น้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

## เอกสารอ้างอิง

### ภาษาไทย

รัชนา พระนิมิต. การคัดแยกยีสต์เพื่อผลิตน้ำมันจากไฮโดรไลเสตของใบอ้อย (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2560.

### ภาษาอังกฤษ

- Bolsoni-Lopes A., Festuccia WT., Farias TS., Chimin P., Torres-Leal FL., Derogis PB., de Andrade PB., Miyamoto S., Lima FB., Curi R., Alonso-Vale MI. (2013). Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR $\alpha$ -dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305(9), 1093–102.
- Boulton C. A., Ratledge C. (1981). Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of atp- citrate lyase. *J Gen Microbiol*, 127, 169-176.
- Boulton C. A., and Ratledge C. (1984). *Cryptococcus terricolus*, an oleaginous yeast re-appraised. *Appl Microbiol Biotechnol*, 20, 72–76.
- Cao H., Gerhold K., Mayers JR., Wiest MM., Watkins SM., Hotamisligil GS. (2008). Identification of lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*, 134, 933–44.
- Chang, Y. H., Chang, K. S., Lee, C. F., Hsu, C. L., Huang, C. W., Jang, H. D. (2015). Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus sp.* in the batch cultures using corncob hydrolysate as carbon source. *Biomass and Bioenergy*, 72, 95-103.
- Christopher T. Evans., Colin R. (1983). Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts. *Journal of General Microbiology*, 130, 1693-1704
- Jintao L., Shuangyue L., Mingzhong S., Cuili Z., Wenbo Y., Zehui Z., Xiaojie L., Shao L. (2014). Microbial lipid production by oleaginous yeast in D-xylose solution using a two-stage culture mode. *RSC Advances*, 4, 34944-34949.
- Low KL, Shui G, Natter K, Wenk MR. Lipid droplet-associated proteins are involved in the biosynthesis and hydrolysis of triacylglycerol in *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *Biological Chemistry*, 2010, 285(28), 21662–21670.

- Ratlidge C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11): 807-815.
- Silvia G., Daniela C., Francesca P., Giuliana F., Daniele B., Concetta C. (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*, 111, 398-403.
- Sitepu, I. R., Garay, L. A., Sestric, R., Levin, D., Block, D. E., German, J. B., Boundy-Mills, K. L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 32(7), 1336-1360.
- Xiang-feng H., Yi S., Hui-juan L., Jia-nan L., Jia L. (2018). Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid. *Bioresource Technology*, 247, 395-401.

### เอกสารอ้างอิงออนไลน์

- เอ็มเอสดี. 2561. [www.msd-thailand.com/our-work/Diabetes/](http://www.msd-thailand.com/our-work/Diabetes/). เข้าถึงเมื่อ 16 พฤษภาคม 2562.
- เมตไทย. 2562. <https://medthai.com/โรคหลอดเลือดหัวใจ/>. เข้าถึงเมื่อ 16 พฤษภาคม 2562.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.  
อาหารเลี้ยงเชื้อ

**Yeast malt extract medium (YM medium)**

กลูโคส 10 กรัม/ลิตร

มอลต์สกัด 3 กรัม/ลิตร

เปปโทน 5 กรัม/ลิตร

ยีสต์สกัด 3 กรัม/ลิตร

พีเอช 5.5

**Glucose + Yeast nitrogen base (G+YNB)**

กลูโคส 30 กรัม/ลิตร

ยีสต์ไนโตรเจนพื้นฐาน 0.67กรัม/ลิตร (G+YNB)

พีเอช 5.5

**Glucose + PKW (G+PKW)**

กลูโคส 30 กรัม/ลิตร

กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน 99 กรัม/ลิตร

พีเอช 5.5

ภาคผนวก ข.

สารละลาย

chloroform : methanol (2:1 v/v)

chloroform (CHCl<sub>3</sub>)

methanol

0.73% sodium chloride (NaCl)

sodium chloride (NaCl)

## ภาคผนวก ค.

## ตารางข้อมูลดิบ

ผลของอาหารเหลวแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ชั่วโมงที่	ค่าความขุ่นเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร		
	YM	G+YNB	G+PKW
0	0.501±0.0006	0.501±0.002	0.501±0.002
24	2.377±0.039	2.100±0.042	1.991±0.028
48	2.336±0.029	2.147667±0.037	2.207±0.035

ตารางที่ 1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM, G+YNB และG+PKW ต่อการเจริญของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ผลของจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

จำนวนเซลล์ยีสต์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณน้ำมันภายใน เซลล์ %(กรัม/กรัม)	ผลผลิตน้ำมันสุทธิ (กรัม/ลิตร)
$2 \times 10^7$	0.147±0.020	<1	-
$2 \times 10^8$	8.422±1.366	10.36±1.872	0.874±0.211
$2 \times 10^9$	16.203±1.789	1.693±0.140	0.274±0.013

ตารางที่ 2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ และผลผลิตน้ำมันสุทธิของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อแปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่แขวนลอยในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ

ผลของจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อการผลิตน้ำมันของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2

ค่าพีเอชของอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ % (กรัม/กรัม)	ผลผลิตน้ำมันสุทธิ (กรัม/ลิตร)
3.5	6.066±1.652	10.767±2.877	0.680±0.327
4.5	6.479±0.690	12.053±4.689	0.782±0.330
5.5	8.414±0.000	8.64±0.000	0.727±0.000
6.5	6.441±1.469	12.356±1.939	0.798±0.248
7.5	7.701±1.453	14.347±0.281	1.106±0.217

ตารางที่ 3 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ และผลผลิตน้ำมันสุทธิของยีสต์ *Cyberlindnera subsufficiens* NG 8.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีคาร์บอนสูงแต่ไนโตรเจนต่ำที่มีค่าพีเอชต่างๆ